



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
L Instituto de Ciências da Saúde

**CONTAGEM DE NEUTRÓFILOS EM DOENTES LEUCOPÉNICOS: COMPARAÇÃO DO
AUTOANALISADOR HEMATOLÓGICO XE-2100 COM O SISTEMA DE ANÁLISE DE
IMAGEM CELLAVISION DM96**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica
Portuguesa para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública

Por Cristina Maria Fernandes da Silva

Sob orientação do Prof. Doutor Rui Manuel Ferreira Henrique e do Dr. Carlos Alberto
da Costa Mendes

Fevereiro 2011

RESUMO

A neutropenia febril (NF) está associada à deterioração da qualidade de vida, consumo de recursos associados ao tratamento e redução/adiamento da terapêutica. Pode inclusivamente comprometer a taxa de cura ou sobrevivência livre de doença, sendo que a taxa de mortalidade é de aproximadamente 5% numa população não seleccionada (variando entre 1% para tumores sólidos e 11 % para neoplasias hematológicas). Embora a incidência de NF seja, geralmente, baixa, pode atingir 33% ou mais em neoplasias do foro hematológico. Assim, no contexto de um Centro Oncológico, a NF constitui um problema de grande importância clínica, sendo requerida uma resposta rápida e precisa do laboratório de Hematologia quanto à avaliação do hemograma para a tomada de decisões críticas. Na actualidade, os laboratórios de Hematologia realizam, de forma sistemática, a avaliação do hemograma com recurso a sistemas de contagem total e diferencial automatizados. Contudo, nas situações de leucopenia, subsistem dúvidas quanto à fiabilidade desta contagem sendo que o padrão de avaliação – contagem manual – é um método moroso e que requer grande experiência. Assim, foram objectivos deste trabalho: (1) avaliar a contagem de neutrófilos em doentes leucopénicos (contagem total de leucócitos entre $0,1 \times 10^9/L$ e $1,5 \times 10^9/L$), (2) comparar a contagem absoluta de neutrófilos (ANC) realizada no autoanalisador hematológico XE-2100 Sysmex com a do sistema de análise de imagem CellaVision DM96, e (3) estabelecer o limite mínimo da confiança para reportar o valor de neutrófilos obtido no contador automático XE-2100 Sysmex na rotina do laboratório de Hematologia.

Foram utilizadas amostras de doentes leucopénicos analisadas na rotina do laboratório de Hematologia cuja contagem total de leucócitos obtida no XE-2100 estava compreendida entre $0,1 \times 10^9/L$ e $1,5 \times 10^9/L$. Os esfregaços correspondentes foram simultaneamente analisados no CellaVision com o *Blood Differential Software*.

De um total de 267 amostras analisadas, excluímos 19 (7,1%) por erro de contagem no XE-2100 e 20 (7,5%) por apresentarem uma contagem de células inferior a 20 no CellaVision. Dos 19 resultados com erro de leitura no XE-2100, foi possível obter o ANC no CellaVision em 16 (84%). Quando comparamos o ANC determinado pelo analisador automático XE-2100 com o do sistema de análise de imagem CellaVision,

verificamos que a diferença das médias não foi estatisticamente significativa (teste t de *Student* para amostras emparelhadas, $p > 0,05$). O índice de correlação global entre os resultados dos 2 sistemas foi elevado e estatisticamente significativo (teste de Pearson, $r=0,959$, $p < 0,001$). A mesma análise foi realizada em função da contagem absoluta de leucócitos (WBC), segundo intervalos dos percentis da distribuição. O índice de correlação incrementou à medida que o número de leucócitos aumentou, apresentando sempre valores superiores a 92% e estatisticamente significativos ($p < 0,001$).

Concluimos que o contador automático XE-2100 fornece valores que permitem relatar com confiança o ANC relativo a doentes leucopénicos. Esta situação pode, por um lado, diminuir o tempo de resposta do laboratório, e por outro, aumentar a informação disponibilizada. Não obstante, o CellaVision parece ser uma ferramenta útil dado permitir rever o esfregaço, monitorizar a evolução hematológica, arquivar imagens e contribuir para a formação e ensino da morfologia.

ABSTRACT

Febrile neutropenia (FN) is associated with deterioration of quality of life, resource consumption associated with treatment and reduced or deferred therapy. The cure rate or disease-free survival may also be compromised, and the mortality rate is approximately 5% in unselected populations (ranging from 1% for solid tumors and 11% for hematologic malignancies). Although the incidence of NF is generally poor, it can reach 33% or more in hematologic malignancies. Thus, in the context of a Cancer Center, FN is a problem of great clinical importance, requiring a rapid and accurate evaluation of the blood by the laboratory of Hematology for taking critical decisions. Currently, the laboratories of Hematology perform the assessment of blood samples by means of automated systems allowing for total and differential leucocyte count. However, in cases of leukopenia, doubts remain about the reliability of this count and the standard of evaluation - manual count – is a time consuming method which requires significant experience. Thus, the objectives of this study were: (1) assess the neutrophil count in leukopenic patients (total leukocyte count between $0.1 \times 10^9 / L$ and $1.5 \times 10^9 / L$), (2) to compare the absolute neutrophil count (ANC) held in hematologic autoanalyzer Sysmex XE-2100 system with the image analysis system CellaVision DM96, and (3) establish the threshold of confidence to report the value of neutrophils obtained in the automated counter Sysmex XE-2100 in a laboratory of Hematology.

Blood samples of leukopenic patients routinely analyzed in the laboratory of Hematology whose total leukocyte count obtained on the XE-2100 was between $0.1 \times 10^9 / L$ and $1.5 \times 10^9 / L$ were enrolled for this study. The corresponding smears were simultaneously analyzed in the Blood Differential Software of CellaVision.

From a total of 267 samples analyzed, we excluded 19 (7.1%) owing to counting error in the XE-2100, and 20 (7.5%) because they had a cell count of less than 20 in CellaVision. Of the 19 results with error reading in XE-2100, it was possible to obtain the ANC in CellaVision in 16 (84%). Comparing the ANC determined by automatic analyzer XE-2100 and the image analysis system CellaVision, we found that the mean difference was not statistically significant (Student's t test for paired samples, $p > 0.05$). The index of overall correlation between the results of the two systems was high and

statistically significant (Pearson test, $r=0.959$, $p<0.001$). The same analysis was performed according to the absolute count of leukocytes (WBC), considering the intervals of the percentiles of the distribution. The correlation index increased as the number of leukocytes increased, with values always above 92% and statistically significant ($p<0.001$).

We concluded that the XE-2100 automated counter provides values that allow the ANC to be reported with confidence on leukopenic patients. This may, on the one hand, decrease the response time of the laboratory, and secondly, to increase the available information. Notwithstanding, CellaVision seems to be a useful tool since it allows the smear review, monitor developments in hematological parameters, archive images, and contribute to training and teaching of morphology.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer principalmente aos meus orientadores Prof. Doutor Rui Henrique e Dr. Carlos Mendes por terem aceite orientar esta tese. Pelo seu saber, pela paciência, rigor científico, disponibilidade, simpatia e permanente estímulo demonstrados no decorrer deste projecto.

Aos colegas do Serviço de Hematologia, que de uma forma ou de outra contribuíram para a minha formação profissional, assim como para a realização deste trabalho, muito obrigada. À Carina, o meu sincero agradecimento pela disponibilidade incondicional no laboratório.

Um agradecimento especial à Dr.^a Teresa com quem partilhei bons momentos durante a frequência deste curso.

Ao Dr. Nuno pela leitura e revisão do trabalho, assim como pelas preciosas sugestões.

Ao Prof. Doutor Elísio Costa, um sincero agradecimento por toda a ajuda e atenção dispensadas na análise estatística dos resultados.

A nível mais pessoal, aqui deixo o meu agradecimento às minhas amigas de sempre, Anabela e Madalena, pelo incentivo, por todos os conhecimentos partilhados, pela imensa ajuda, por estarem sempre presentes nos momentos mais difíceis e acima de tudo pela *Amizade*.

A todos os meus amigos que longe ou perto, de uma forma ou de outra, me acompanharam ao longo deste percurso.

Aos meus pais e irmãos pela constante motivação, incentivo e apoio incondicionais que sempre demonstraram. Muito obrigada!

Aos meus filhos, Carolina, Luís e Daniel, por tudo...

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ANC	contagem absoluta de neutrófilos
ARN	ácido ribonucleico
CTCAE	<i>Common Terminology Criteria for Adverse Events</i>
ESMO	<i>European Society for Medical Oncology</i>
FSC	luz dispersa frontal (<i>forward scatter light</i>)
G-CSF	(<i>granulocyte colony stimulating factor</i>) factor de estimulação do crescimento de colónias de granulócitos
GM-CSF	(<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>) factor de estimulação do crescimento de colónias de granulócitos e macrófagos
ICSH	<i>International Council for Standardization in Haematology</i>
IG	granulócitos imaturos
IL-3	interleucina-3
IPO-Porto	Instituto Português de Oncologia do Porto, Francisco Gentil, E.P.E.
K ₃ EDTA	sal tripotássico do ácido etileno-diamina-tetracético
L	litro
LIS	<i>Laboratory Information System</i>

M-CSF	(<i>macrophage-colony stimulating factor</i>) factor de estimulação do crescimento de colónias de macrófagos.
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
NF	neutropenia febril
NK	células <i>natural killer</i>
NRBC	eritroblastos
PMN	polimorfonucleares neutrófilos
SIS	<i>Sysmex Information System</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
SSC	luz dispersa lateral (<i>side scatter light</i>)
STMO	Serviço de Transplantação de Medula Óssea
WBC	leucócitos

ÍNDICE

Resumo	iii
Abstract.....	v
Agradecimentos	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos	ix
Índice	xi
Índice de figuras	xiii
Índice de tabelas	xv
INTRODUÇÃO	1
Imunidade inata.....	3
Imunodeficiências	8
Neutropenia no doente oncológico	10
Avaliação laboratorial da neutropenia	14
Equipamentos Hematológicos Automáticos	16
Processamento digital de imagem.....	22
OBJECTIVOS	29
MATERIAL E MÉTODOS	33
Amostras Biológicas	35

Contagem diferencial automática com o XE-2100	35
Realização e coloração dos esfregaços	35
Contagem diferencial no Microscópio automático	36
Reclassificação das células	36
Cálculo da contagem absoluta de neutrófilos	37
Análise estatística.....	38
RESULTADOS	39
Amostras Biológicas	41
Contagem diferencial automática com o XE-2100	41
Contagem diferencial no Microscópio automático	41
Reclassificação das células	43
Análise comparativa do desempenho do analisador automático XE-2100 e do sistema de análise de imagem Cellavision DM 96	46
DISCUSSÃO	51
CONCLUSÃO/PERSPECTIVAS FUTURAS	59
BIBLIOGRAFIA	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Tempo de semi-vida do neutrófilo e fases de maturação	6
Figura 2 – Contador Hematológico XE-2100	18
Figura 3 – Representação gráfica da distribuição dos leucócitos	21
Figura 4 - Sistema de análise de imagem CellaVision DM96.....	23
Figura 5 – Exemplos de imagens obtidas no CellaVision	24
Figura 6 – Resultados obtidos com o Sistema CellaVision DM 96	26
Figura 7 – Laboratório de Hematologia. Representação esquemática da distribuição dos diferentes sistemas de análise e processamento de informação	28
Figura 8 – Imagem ampliada de um neutrófilo.	37
Figura 9 – Amostra com erro na contagem diferencial de leucócitos no XE-2100.....	42
Figura 10 – Amostra excluída do estudo	43
Figura 11 – Resultado do hemograma efectuado no XE-2100.....	43
Figura 12 – Análise efectuada com o CellaVision DM96.....	44
Figura 13 - Hemograma analisado no XE-2100.....	44
Figura 14 - Análise efectuada com o CellaVision DM96	44
Figura 15 – Relatório efectuado pelo CellaVision DM96.....	45
Figura 16 – <i>Box-plot</i> comparativo da distribuição das contagens absolutas de neutrófilos nos dois sistemas.	46
Figura 17 – Representação gráfica da correlação do valor absoluto dos neutrófilos avaliado pelos dois sistemas.	47
Figura 18 – Distribuição das amostras de acordo com os intervalos interpercentil	48
Figura 19 – Representação gráfica da correlação do valor absoluto dos neutrófilos avaliado pelos dois sistemas para amostras com valor de WBC inferior ao percentil 25	48

Figura 20 – Representação gráfica da correlação do valor absoluto dos neutrófilos avaliado pelos dois sistemas para amostras com valor de WBC compreendidas entre o percentil 25 e 50.	49
Figura 21 – Representação gráfica da correlação do valor absoluto dos neutrófilos avaliado pelos dois sistemas para amostras com valor de WBC compreendidas entre o percentil 50 e 75	49
Figura 22 – Representação gráfica da correlação do valor absoluto dos neutrófilos avaliado pelos dois sistemas para amostras com valor de WBC superior ao percentil 75	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I – Principais células do sangue periférico	4
Tabela II - Patologias associadas a defeitos das células fagocíticas.....	9
Tabela III – Neutropenias congénitas	9
Tabela IV – Parâmetros hematológicos disponibilizados pelo contador hematológico XE-2100	19
Tabela V – Distribuição das amostras pelos serviços requisitantes	41
Tabela VI - Número de células analisadas utilizando o CellaVision DM96.....	42
Tabela VII – Valor de WBC nos diferentes percentis de distribuição	47

INTRODUÇÃO

A toxicidade hematológica associada à mielossupressão, a consequente neutropenia e as complicações infecciosas continuam a ser o principal factor limitativo na terapêutica do cancro. A redução da intensidade ou o adiamento do tratamento podem diminuir o risco imediato de eventos neutropénicos incluindo a neutropenia febril. No entanto, o impacto destas medidas no posterior comportamento da neoplasia ainda não é conhecido.

Com as várias abordagens clínicas existentes perante situações de neutropenia, parece importante o laboratório de Hematologia ser capaz de disponibilizar a contagem absoluta de neutrófilos com rapidez e rigor, em situações de leucopenia. Na presença de um quadro febril ou sintomatologia infecciosa poderá ajudar o clínico a ter uma intervenção mais rápida, e mais esclarecedora, evitar decisões intuitivas e, consequentemente, evitar custos acrescidos e/ou riscos desnecessários.

Com este trabalho, tentamos verificar se é possível reportar, em tempo útil e com fiabilidade, os valores da contagem absoluta de neutrófilos (ANC) em doentes leucopénicos.

IMUNIDADE INATA

O corpo humano protege-se de muitas formas. A primeira defesa contra microrganismos e outras agressões é a barreira física da pele e mucosas. Quando um agente patogénico ultrapassa esta barreira vai encontrar vários mecanismos de defesa que no seu conjunto formam a imunidade. Tradicionalmente, esta divide-se em dois sistemas funcionais inter-relacionados: a ‘imunidade inata’ ou ‘natural’ e a ‘imunidade adquirida’ ou ‘adaptativa’¹.

A função primária do Sistema Imunológico é a protecção do organismo contra a infecção. A imunidade inata é garantida por mecanismos e processos fisiológicos que existem, praticamente, em todo o reino animal. Ao longo da evolução filogenética das espécies não se têm verificado muitas alterações nestes mecanismos de resposta¹. Para se desencadear não é necessária uma exposição prévia ao microrganismo e não muda

significativamente com exposições repetidas. Funciona basicamente com a interação entre células com capacidade fagocítica e proteínas do sangue ².

Na Tabela I estão indicadas as concentrações e percentagens aproximadas das principais células do sangue periférico humano. Um microlitro de sangue de um adulto tem cerca de 7000 glóbulos brancos e cerca de 5 milhões de glóbulos vermelhos. O número de plaquetas é de aproximadamente 300 000 ³.

Tabela I – Principais células do sangue periférico. [Adaptado de Arosa A., 2007 (4)]

Tipo de células	Concentração (células/mm ³)	Percentagem aproximada (%)
Eritrócitos	5×10^6	
Plaquetas	3×10^5	
Leucócitos	7×10^3	
Linfócitos		30,0
Neutrófilos		62,0
Monócitos		5,3
Eosinófilos		2,3
Basófilos		0,4

Células Fagocíticas: Granulócitos Neutrófilos

A fagocitose é o mecanismo principal da imunidade inata. Os mecanismos de defesa estabelecem-se poucas horas depois do organismo ter sido invadido por um agente patogénico. Neste processo, o microrganismo é revestido por elementos do sangue como o complemento, que induz a libertação de enzimas líticas e citotóxicas a partir de células sanguíneas ¹.

Virtualmente, todos os tipos de leucócitos contribuem para a defesa do organismo. As células da linhagem monocítico-macrofágica e os neutrófilos são células fagocíticas. Os linfócitos têm uma capacidade fagocítica reduzida e a sua função de defesa é colectivamente denominada ‘resposta imunológica’. Os linfócitos são as principais células envolvidas na resposta imunológica adquirida ².

Neutrófilos

Os neutrófilos são células que medem 12-15 µm de diâmetro. No seu estado mais diferenciado, também são denominados leucócitos polimorfonucleares neutrófilos

(PMN) ou neutrófilos segmentados. O seu citoplasma tem numerosos grânulos. O núcleo apresenta a cromatina condensada e a sua principal característica é a sua forma: apresenta-se segmentado em dois a cinco lobos unidos por filamentos de heterocromatina densa, envolvida por membrana nuclear ^{5,6}. A semi-vida de um neutrófilo no sangue periférico é de 6 a 10 horas ⁷.

A produção dos neutrófilos envolve a acção de uma variedade de factores de crescimento incluindo o factor de estimulação do crescimento de colónias de granulócitos (G-SCF), o factor de estimulação do crescimento de colónias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF), interleucina-3 (IL-3) e o factor de estimulação do crescimento de colónias de macrófagos (M-CSF). Os factores de crescimento estimulam a produção, a diferenciação e também actuam sobre as células diferenciadas, por exemplo estimulando a fagocitose ^{5,7}.

Os neutrófilos contêm três tipos de grânulos. Os grânulos primários são grânulos azurófilos, presentes já no promielócito e em todas as outras fases de diferenciação do neutrófilo. Contêm enzimas microbicidas e hidrolases ácidas (mieloperoxidase, defensinas e lisozima) envolvidas na morte de bactérias e fungos. Os grânulos secundários ou específicos, são mais pequenos que os grânulos primários, contêm outras enzimas hidrolíticas e receptores de proteínas de adesão. Os grânulos terciários incluem as vesículas secretoras que contêm fosfatase alcalina e grânulos ricos em gelatinase. A libertação do conteúdo dos grânulos é importante no processo da fagocitose e morte dos microrganismos, no entanto, a sua libertação também destrói as células envolventes causando inflamação ^{2,4,5}.

A maior proporção de neutrófilos existe como reserva na medula óssea. Os restantes neutrófilos estão na corrente sanguínea e nos tecidos, uma parte encontra-se marginada ao longo do revestimento endotelial dos vasos em equilíbrio dinâmico com os neutrófilos circulantes ⁵ (Figura 1).

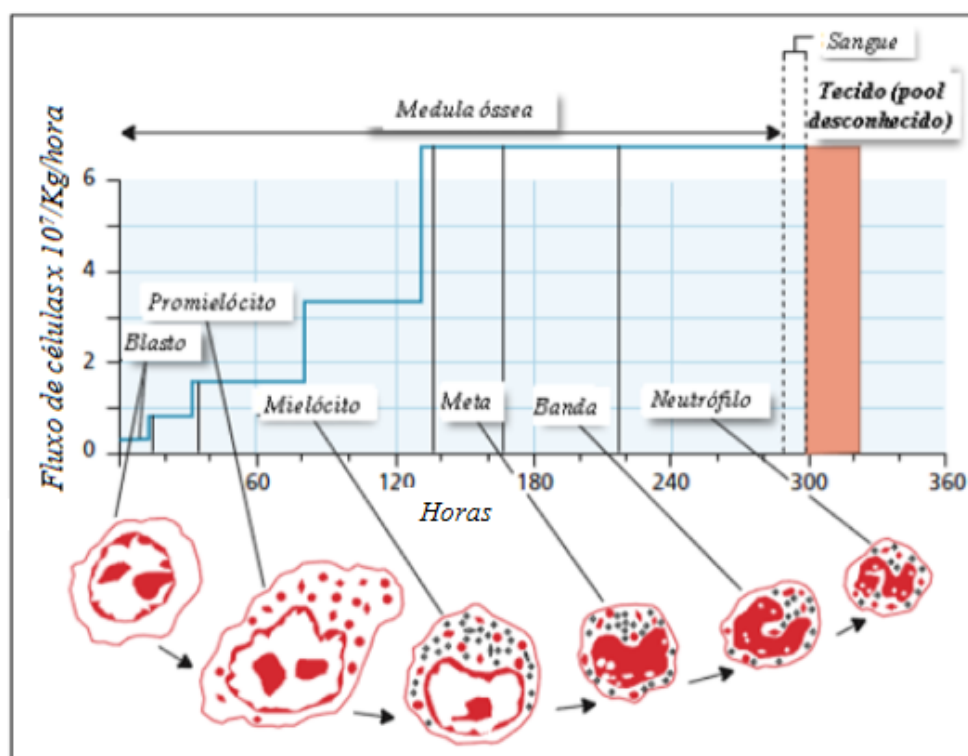


Figura 1 – Tempo de semi-vida do neutrófilo e fases de maturação. Nas ordenadas está representada a sequência de maturação e nas abscissas o tempo demorado em cada fase. A linha azul representa as sucessivas divisões mitóticas. [Adaptado de Hofbrand, *et al*, 2005 (5)].

Neutropoiese (Mielopoiese)

Os diferentes leucócitos formam-se na medula óssea e têm um precursor comum, a célula estaminal hematopoiética. A sua maturação passa por várias fases num processo denominado hematopoiese. Esta célula tem, por um lado, a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares e por outro, a de se auto-renovar e dividir indefinidamente. Dá origem a dois tipos de células estaminais: a célula progenitora linfóide e a célula progenitora mielóide. A célula progenitora linfóide diferencia-se nos linfócitos T, B e NK. A célula progenitora mielóide origina os outros leucócitos (monócitos e granulócitos), os eritroblastos e os megacariócitos⁴.

As células precursoras mielóides não estão presentes no sangue periférico de um indivíduo saudável. A sua presença está normalmente associada a processos patológicos que podem ser reactivos ou neoplásicos. Quando estas células estão em circulação no sangue periférico, são facilmente identificáveis.

Mieloblasto

O mieloblasto é a célula precursora mielóide mais imatura. É uma célula grande, (12 a 20µm de diâmetro), com uma grande relação núcleo/citoplasma e o seu núcleo tem uma forma redonda ou ligeiramente oval. O núcleo apresenta a cromatina pouco densa, com dois a cinco nucléolos. O citoplasma é basófilo e não apresenta granulações visíveis por microscopia óptica (no entanto, podem ser observadas por microscopia electrónica ou técnicas de citoquímica). Dá origem ao promielócito por divisão mitótica^{6,8}.

Promielócito

O promielócito é uma célula maior que o mieloblasto, (15-25µm de diâmetro). A relação núcleo/citoplasma é menor que no mieloblasto e o seu citoplasma é basófilo. A sua cromatina é mais densa e os nucléolos ainda podem ser visíveis. A zona de Golgi é visível como uma área mais clara junto ao núcleo. É no promielócito que surgem os grânulos primários azurófilos^{6,8}.

Mielócito

O mielócito é uma célula mais pequena que o promielócito, (10-20µm de diâmetro). Este é o último precursor mielóide com capacidade mitótica. A sua cromatina é mais densa e os seus nucléolos já não são visíveis. A principal característica desta célula é a presença de granulações secundárias, específicas, que podem ser do tipo neutrófilo, eosinófilo ou basófilo. O seu citoplasma é fracamente basófilo. Por divisão mitótica e maturação dá origem ao metamielócito^{6,8}.

Metamielócito

O metamielócito é uma célula que mede 10-12µm de diâmetro. A sua cromatina está condensada e o núcleo tem uma forma indentada (em U), o seu citoplasma é menos basófilo do que o do mielócito. Esta célula já não sofre divisão e a sua capacidade de produção proteica é muito reduzida ou inexistente^{6,8}.

Neutrófilo em banda

Os neutrófilos em banda caracterizam-se pela forma do seu núcleo, em ferradura ou em banda. O seu citoplasma apresenta granulações secundárias e é muito semelhante ao citoplasma do neutrófilo maduro ^{6,8}.

IMUNODEFICIÊNCIAS

Os defeitos em qualquer componente do sistema imunológico predis põem o organismo à doença. As doenças do sistema imunológico são genericamente denominadas imunodeficiências. As imunodeficiências podem ser classificadas em primárias (genéticas) ou secundárias (adquiridas). As imunodeficiências primárias resultam de defeitos genéticos, com manifestação clínica durante a infância (por vezes no período neonatal). As imunodeficiências primárias podem afectar o sistema imunológico ao nível da resposta inata ou adaptativa ⁹. As imunodeficiências adquiridas são mais comuns e resultam de efeitos nocivos de outros agentes, nomeadamente microrganismos, agentes tóxicos ou mesmo doenças de outros órgãos que afectam o sistema imunológico comprometendo-o e causando as denominadas doenças auto-imunes ¹⁰.

Deficiências primárias dos fagócitos

A fagocitose efectuada pelos macrófagos e pelos neutrófilos é o principal mecanismo pelo qual o sistema imunológico destrói as bactérias e outros microrganismos. Assim, qualquer alteração que comprometa a actividade destas células tem um efeito directo sobre a capacidade efectora num processo infeccioso. Os défices das células fagocíticas podem agrupar-se em funcionais e quantitativos (as neutropenias). Na sua maioria, os défices funcionais cursam com um número normal de neutrófilos no sangue periférico ¹⁰.

Défices funcionais

Os défices de função dos fagócitos incluem defeitos num ou em vários dos seus mecanismos efectores. Na Tabela II estão representados alguns exemplos de deficiências das células fagocíticas com as respectivas alterações celulares, imunológicas e infecções que lhes estão frequentemente associadas.

Tabela II - Patologias associadas a defeitos das células fagocíticas. [Adaptado de Parham, P., 2001 (11)].

Patologia	Alteração celular	Defeito imune	Infecções e doenças associadas
Deficiência de adesão dos leucócitos	Alteração na molécula de adesão CD18	A migração aos tecidos está comprometida	Infecções disseminadas com bactérias capsuladas
Doença granulomatosa crónica	Alteração na enzima NADP. As células fagocíticas não produzem oxigénio	As bactérias são fagocitadas mas não são mortas. Defeito no <i>burst</i> oxidativo	Infecções crónicas bacterianas e fúngicas. Granulomas
Deficiências de grânulos	Alterações nos grânulos, défice na produção de espécies reactivas de oxigénio	As bactérias são fagocitadas mas não são mortas	Infecções crónicas bacterianas e fúngicas
Síndrome de Chediak-Higashi	Alterações a nível da fusão das vesículas	Impede a fagocitose porque não há fusão dos endossomas com os lisossomas	Infecções bacterianas recorrentes e persistentes. Granulomas

NADP – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

Défices quantitativos

Os défices quantitativos podem variar entre a ausência de neutrófilos denominada agranulocitose e uma redução na contagem de neutrófilos circulantes para valores inferiores a $1,5 \times 10^9/L$ denominada neutropenia⁹. Estas deficiências quantitativas podem dever-se a defeitos genéticos ou ser adquiridas por factores extrínsecos. As neutropenias congénitas são mais raras do que as secundárias (frequentemente de causa infecciosa, iatrogénica ou imunológica). Caracterizam-se por neutropenia (crónica ou recorrente) definida por um valor absoluto de neutrófilos no sangue periférico inferior a $1,5 \times 10^9/L$ ⁹.

Na tabela III estão representadas algumas das neutropenias congénitas mais frequentes e as alterações celulares e imunológicas que lhes estão associadas¹⁰.

Tabela III – Neutropenias congénitas.[Adaptado de Santos, E., 2007 (10)].

Patologia	Alteração celular	Defeito imune
Neutropenia severa congénita	Mutações no gene que codifica a elastase, alterações no gene receptor do G-CSF	Neutropenia muito grave ($ANC < 0,2 \times 10^9/L$)
Neutropenia cíclica	Mutações no gene que codifica a elastase	Oscilação na produção de neutrófilos com variações cíclicas no número de neutrófilos
Síndrome de Shwasman-Diamond	Mutações no gene SBDS	Neutropenia crónica hiperplásica, défice na quimiotaxia dos neutrófilos

G-CSF – factor de estimulação do crescimento de colónias de granulócitos; SBDS – Shwachman-bodian-Diamond syndrome

A neutropenia causada por quimioterapia pode predispor o doente a infecções graves com risco de vida. Esta situação é mais frequente quando o valor dos neutrófilos é inferior a $0,5 \times 10^9/L$. Os microrganismos encontrados com maior frequência nestas circunstâncias são: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella spp* ⁵.

Imunodeficiências secundárias

Neutropenias secundárias

Como foi referido anteriormente, os neutrófilos têm uma semi-vida curta. Os seus precursores estão em permanente divisão na medula óssea para manter os níveis das células em circulação. Por este motivo, agentes como a radiação e alguns fármacos (nomeadamente os antineoplásicos) que actuam especificamente em células com elevada actividade mitótica causam neutropenia. Ocasionalmente, a neutropenia surge associada a doenças auto-imunes, como o Lúpus Eritematoso Sistémico e o Síndrome de Sjögren. Nestas doenças, ocorre a produção de auto-anticorpos que destroem os neutrófilos. A neutropenia também pode ser observada de forma transitória em alguns processos infecciosos provocados por determinadas bactérias e vírus. Nestas situações o número de neutrófilos regressa aos seus valores normais quando a infecção está resolvida ⁹.

NEUTROPENIA NO DOENTE ONCOLÓGICO

O tratamento do cancro tem evoluído de forma significativa nos últimos anos. A sobrevivência destes doentes também tem aumentado. Isto deve-se em grande parte ao aparecimento de novos regimes de quimioterapia que em alguns casos são seguidos de transplantação de precursores hematopoiéticos.

As terapêuticas antineoplásicas e imunossupressoras afectam gravemente as células e as funções do sistema imunológico e causam quadros graves de imunodeficiências secundárias. Uma grande parte das terapêuticas antineoplásicas tem como alvo principal a inibição da síntese de ADN e a paragem da divisão celular. Desta forma, as células que se encontram em divisão activa são as mais afectadas, levando à sua destruição. Como as células que estão associadas à resposta imunológica também estão em divisão activa são igualmente afectadas durante estes tratamentos ¹⁰.

A quimioterapia actua frequentemente sobre o sistema hematopoiético suprimindo-o. Desta forma, prejudica os mecanismos de defesa do hospedeiro humano. Em consequência disto, surgem nestes doentes complicações que podem pôr em risco a própria vida. Uma das principais complicações prende-se com a baixa na produção de neutrófilos. Assim, a quimioterapia predispõe o doente às infecções. A neutropenia impede a resposta apropriada às infecções permitindo a invasão e multiplicação dos diferentes agentes infecciosos.

O *National Cancer Institute* elaborou um sistema de classificação (em graus de toxicidade) de vários efeitos adversos relacionados com as diferentes terapêuticas do cancro. Este sistema denominado *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE) classifica a neutropenia numa escala de zero a cinco. O grau 5 corresponde à morte. O grau 4 de neutropenia é definido como uma contagem absoluta de neutrófilos inferior a $0,5 \times 10^9$ células/L, usualmente referido como uma contagem de neutrófilos inferior a 500/ μ L. Por comparação, o grau zero corresponde aos valores normais da contagem de neutrófilos e que variam entre 3,0 e $6,0 \times 10^9$ células/L. O grau 1 é denominado de neutropenia ligeira e refere-se a uma contagem de neutrófilos entre 3,0 e $1,5 \times 10^9$ células/L. O grau 2 (neutropenia moderada) considera a contagem de neutrófilos entre 1,5 e $1,0 \times 10^9$ células/L. A neutropenia severa ou grau 3 corresponde a um ANC entre 1,0 e $0,5 \times 10^9$ células/L ¹².

Neutropenia Febril

Uma definição rigorosa e padronizada de neutropenia febril, é muito importante para poder unificar os algoritmos e as recomendações existentes nos vários grupos de trabalho. A *European Society for Medical Oncology* (ESMO) propôs a seguinte definição de neutropenia: ANC $<0,5 \times 10^9$ /L ou ANC $<1,0 \times 10^9$ /L prevendo-se que diminua para valores de ANC $<0,5 \times 10^9$ /L. Quando a esta contagem de neutrófilos se associa um episódio de febre estamos perante uma situação que é considerada uma emergência em medicina designada ‘Neutropenia Febril’ ¹³⁻¹⁶. A ESMO definiu ‘febre’ como o registo de uma temperatura axilar de 38,5°C ou temperatura superior a 38,3°C sustentada pelo menos durante uma hora ¹⁶.

Apesar dos avanços na prevenção e tratamento, a neutropenia febril (NF) continua a ser uma das complicações mais temidas na terapêutica do cancro. A NF está

associada à deterioração da qualidade de vida, consumo de recursos associados ao tratamento e redução/adiamento da terapêutica. Pode inclusivamente comprometer a taxa de cura ou sobrevivência livre de doença para uma determinada neoplasia ¹⁷.

A mortalidade por NF diminuiu mas continua a ser significativa ^{13,14}. A taxa de mortalidade por NF é de aproximadamente 5% numa população não seleccionada ^{14, 17}. Estes valores podem variar entre 1% de mortalidade para tumores sólidos e os 11 % no caso de neoplasias hematológicas ¹⁴. A incidência de NF pode atingir valores de 33% ou mais em algumas neoplasias do foro hematológico ¹⁷.

Neutropenia e infecção

Há mais de 40 anos Bodey *et al* demonstraram que a infecção está directamente relacionada com a contagem absoluta de neutrófilos existentes em circulação, principalmente quando esta contagem apresenta valores inferiores a $0,5 \times 10^9/L$. Estes autores demonstraram que o grau e a duração da neutropenia determinam o risco de infecção permitindo ao clínico ter diferentes atitudes, não só no tratamento como na profilaxia de determinadas infecções ¹⁸. Nos doentes leucopénicos a avaliação da neutropenia é muito importante e a sua quantificação pode ser decisiva nas atitudes clínicas.

Factores de risco de desenvolver NF

A importância do uso empírico de antibióticos no tratamento precoce da neutropenia febril foi demonstrada há mais de 30 anos. O trabalho de Schimpff *et al* mostrou uma drástica redução da mortalidade por *Pseudomonas spp* com a introdução de gentamicina e carbenicilina em doentes com NF¹⁹. Nos últimos anos, as organizações internacionais que investigam o cancro como a *American Society of Clinical Oncology* (ASCO), a *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) e a *European Organisation for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) têm formado grupos de trabalho no sentido de elaborar protocolos com orientações clínicas para a abordagem da NF ^{14,20}. A elaboração destas orientações tem por base a estratificação do risco de desenvolver NF.

Vários modelos têm sido desenvolvidos no sentido de identificar o mais precocemente possível quais os doentes que irão desenvolver NF, se possível ainda

antes de iniciar o regime de quimioterapia ¹⁶. O risco de NF pode ser considerado alto (risco superior a 20%), moderado (risco entre 10 e 20%) ou baixo (inferior a 10%) em função do regime de quimioterapia instituído ^{13,14}.

Além do risco que está associado a cada terapêutica, são vários os factores que o podem aumentar, sendo os mais importantes: a idade (se superior a 65 anos), o estado geral do doente, envolvimento medular pela neoplasia, administração combinada de quimioterapia e radioterapia, mau estado nutricional, presença de feridas abertas ou infecções activas e estado avançado da neoplasia ^{16,21}.

Factores de crescimento

O uso profilático de factores de crescimento reduz a gravidade e a duração da neutropenia induzida pela quimioterapia e, consequentemente, o risco de NF ^{13,17}. O uso profilático de G-CSF é recomendado pela ASCO, pela NCCN e, mais recentemente, pela EORTC, quando o risco de desenvolver NF é superior a 20% ^{13,16-17}.

Os factores clínicos descritos anteriormente que estão associados a cada doente, devem ser avaliados no sentido da instituição ou não de G-CSF antes do início de cada regime de quimioterapia.

Neutropenia e quimioterapia

Os Centros de Oncologia são Instituições em que as necessidades de resposta do laboratório de Hematologia apresentam características particulares. São hospitais onde há um elevado número de doentes em regime de quimioterapia e/ou radioterapia com as consequentes alterações hematológicas referidas anteriormente.

Os regimes de quimioterapia incluem vários critérios de exclusão. A contagem absoluta de neutrófilos faz geralmente parte desses critérios. O valor mínimo aceite para iniciar um novo ciclo de quimioterapia situa-se entre valores de 0,5 e $1,5 \times 10^9/L$ ²². Em muitos protocolos e ensaios clínicos, o grau 2 de toxicidade da classificação CTCAE é o limite mínimo para a intervenção terapêutica ²³.

O Instituto Português de Oncologia do Porto, Francisco Gentil, E.P.E. (IPO-Porto), onde este trabalho foi desenvolvido, orienta-se pelas *guidelines* internacionais associadas a cada patologia e a cada tratamento. É importante referir que, embora as

várias *guidelines* definam limites para a implementação ou não da terapêutica, a abordagem de cada doente é sempre uma situação única. O doente é visto clinicamente como um todo e são avaliados vários parâmetros como a sua idade, o estadió da doença e comorbilidades associadas. Depois desta abordagem cabe ao médico tomar a decisão sobre a instituição ou não de um novo regime de quimioterapia.

Quando um doente é admitido de novo na Instituição, é realizada uma avaliação clínico-laboratorial multidisciplinar. Nesse contexto, o hemograma é um dos exames complementares de diagnóstico mais requisitados.

No laboratório de Hematologia é feita uma avaliação morfológica completa do sangue periférico. Nos doentes que estão internados e/ou em tratamento, a informação que é pertinente prende-se muitas vezes com o valor da concentração de hemoglobina e da contagem de plaquetas para avaliação das necessidades transfusionais. Relativamente à contagem diferencial de leucócitos, nestes doentes, o valor de ANC parece fornecer informação suficiente sobre o estado da medula óssea, permitindo tomar decisões sobre iniciar ou monitorizar terapêuticas citotóxicas ou mielossupressoras.

A terapêutica utilizada no tratamento oncológico apresenta diversos efeitos colaterais. Muitos tratamentos também causam mielossupressão que resulta numa neutropenia que pode ser grave e que em algumas situações se prolonga por períodos de duas a três semanas. Além dos tratamentos de quimioterapia e radioterapia, o recurso a transplantação de medula óssea ou precursores hematopoiéticos têm vindo a aumentar. Esta realidade faz aumentar o número de doentes neutropénicos que é necessário monitorizar dentro da Instituição.

Como resultado desta neutropenia podem surgir infecções por agentes patogénicos oportunistas. Alguns doentes também desenvolvem infecções fúngicas que podem requerer terapêutica adequada. Por seu lado, as infecções víricas são observadas com mais frequência nos doentes que foram submetidos a transplantação de precursores hematopoiéticos²⁴.

AValiação Laboratorial da Neutropenia

A avaliação da neutropenia é uma análise laboratorial que faz parte do estudo de rotina que é realizado no laboratório de Hematologia.

Contagem diferencial de leucócitos

A contagem total de leucócitos (WBC) e a contagem diferencial de leucócitos são dois dos testes laboratoriais mais requisitados pelos clínicos. Actualmente estas análises estão automatizadas. No entanto, uma correcta interpretação dos resultados implica um conhecimento aprofundado dos instrumentos utilizados e do possível significado clínico dos resultados por eles fornecidos²⁵.

A contagem diferencial de leucócitos consiste na quantificação das cinco populações de leucócitos presentes no sangue periférico. Embora derivem da mesma célula progenitora e interajam umas com as outras, cada população pode ser considerada relativamente independente em termos de maturação, função e mecanismo de controlo²⁵. Actualmente, a forma de obter esta contagem reside essencialmente na utilização de contadores automáticos.

A precisão e exactidão dos contadores automáticos para a contagem diferencial de leucócitos foram validadas em numerosos estudos²⁶. Como consequência, a contagem diferencial manual é cada vez menos utilizada. Com o aparecimento da automatização, a revisão do esfregaço está associada às próprias mensagens e/ou alarmes emitidos pelos contadores automáticos. Isto, aliado à necessidade de uma resposta cada vez mais rápida, leva à procura da optimização dos recursos disponíveis.

A contagem diferencial de leucócitos expressa em percentagem de cada tipo de células pode induzir em erro. Segundo as recomendações da ICSH (*International Council for Standardization in Haematology*) a contagem diferencial de leucócitos deve ser fornecida em número absoluto de cada tipo de células por unidade de volume de sangue para facilitar a interpretação dos resultados²⁷.

A contagem diferencial deve fundamentar-se em dois princípios básicos: (I) a procura de alterações quantitativas nas diferentes populações de leucócitos (*e.g.*, no diagnóstico de infecções ou na monitorização de terapêuticas citotóxicas ou mielossupressoras) que requerem elevados níveis de precisão e exactidão; (II) a procura de alterações qualitativas, isto é, a identificação de células imaturas ou atípicas para fins de diagnóstico ou monitorização de determinadas patologias, o que requer um nível elevado de sensibilidade clínica²⁵.

Contagem diferencial de leucócitos por microscopia óptica

Para obter a informação necessária a partir de um esfregaço de sangue periférico, ele deve ser correctamente efectuado e a coloração deve ser apropriada. A execução do esfregaço de sangue periférico e a sua coloração são dois pré-requisitos fundamentais para examinar a morfologia de uma amostra de sangue por microscopia óptica. As colorações normalmente usadas são o *Wright*, o *Giemsa*, o *Wright-Giemsa* e o *May-Grünwald-Giemsa (Pappenheim)*.

O esfregaço é observado com objectivas de 20-40x, o que permite visualizar a densidade celular do esfregaço, a série rubra e plaquetária. A observação morfológica individual das células, a análise das alterações qualitativas e a contagem diferencial é feita utilizando objectivas de 50-100x, com recurso a óleo de imersão.

O método tradicional da contagem diferencial de leucócitos baseia-se na contagem de 200 células. Esta contagem está sujeita a três tipos de erro: estatístico, na distribuição desigual das células no esfregaço e na identificação das células relativamente à interpretação subjectiva do observador.

EQUIPAMENTOS HEMATOLÓGICOS AUTOMÁTICOS

O laboratório de Hematologia integrado num hospital processa um elevado número de amostras. Isto só é possível devido ao grau de automatização actualmente existente.

Com a introdução de novas tecnologias de análise celular, ao longo dos últimos vinte anos, aliada ao progresso das aplicações informáticas, os contadores automáticos sofreram uma acentuada evolução. Em consequência, verificou-se um aumento da rapidez e eficácia da resposta do laboratório de Hematologia. Por outro lado, o desenvolvimento tecnológico veio acrescentar mais informação aos resultados. Estas mudanças implicam a necessidade de um conhecimento mais especializado para poder explorar as possíveis aplicações clínicas dos novos resultados^{25,28}.

Em adição aos parâmetros clássicos do hemograma com a contagem total de leucócitos e a contagem diferencial nas cinco populações, os autoanalisadores que surgiram nos últimos anos dão mais informação quantitativa com a introdução de novos

parâmetros, como a contagem de eritroblastos (NRBC) e mais informação qualitativa. Esta última é feita pela emissão de mensagens denominadas pelo sistema de *Flags* que alertam para problemas técnicos (*e.g.*, erro de funcionamento ou interferência analítica) e, mais importante, alertam para a presença de células que normalmente estão ausentes no sangue periférico (*e.g.*, células blásticas, linfócitos atípicos, células imaturas e eritroblastos)²⁵.

Outra funcionalidade dos autoanalisadores é a possibilidade de comparar os resultados actuais com resultados anteriores do mesmo doente. Para estas situações, é definido um conjunto de regras (*Delta check*) cuja alteração permite desencadear uma mensagem. Desta forma, quando o hematologista está a validar um hemograma, que apresenta um desvio desta natureza, é alertado automaticamente.

A emissão de mensagens activa o procedimento de verificação do hemograma que habitualmente compreende a revisão do esfregaço por microscopia óptica²⁹.

Contador Hematológico Sysmex XE-2100

O contador hematológico Sysmex XE-2100 (*TOA Medical Electronics, Kobe, Japan*) processa em média 150 amostras por hora e disponibiliza 35 parâmetros hematológicos incluindo contagem de reticulócitos e de eritroblastos (NRBC)^{28,30}, (Figura 2 e Tabela IV).

A capacidade de resposta rápida dos autoanalisadores tem um impacto positivo nos laboratórios com um elevado número de hemogramas. Desde o aparecimento do Sysmex XE-2100 no mercado que vários estudos têm demonstrado o seu bom desempenho. Os resultados mostram valores elevados de precisão e exatidão, não só na contagem diferencial de células como nas mensagens emitidas pelo contador automático, quando comparados com a observação ao microscópio óptico^{28,30}.

Tsuda *et al* efectuaram uma avaliação do desempenho do autoanalisador XE-2100 relativamente à reprodutibilidade, estabilidade da amostra ao longo do tempo e comparação com outros autoanalisadores²⁸. Estes autores verificaram que o coeficiente de variação para a contagem diferencial de leucócitos se situava entre 1,2% para os neutrófilos e 18,3% para os basófilos. Neste trabalho a contagem de WBC estava compreendida entre $3,3$ e $234,6 \times 10^9$ células/L²⁸.



Figura 2 – Contador Hematológico XE-2100

Tabela IV – Parâmetros hematológicos disponibilizados pelo contador hematológico XE-2100. [Adaptado de Garvey, 2003 (31)]

Parâmetro	Abreviatura e unidade usada	Parâmetro	Abreviatura e unidade usada
Contagem de leucócitos	WBC ($10^9/L$)	Contagem de eritrócitos	RBC ($10^{12}/L$)
Percentagem de neutrófilos	NEUT (%)	Hemoglobina	HGB (G/dL)
Contagem absoluta de neutrófilos	NEUT ($10^9/L$)	Hematócrito	HTC (L/L)
Percentagem de linfócitos	LYMPH (%)	Volume globular médio	MCV (fL)
Contagem absoluta de linfócitos	LYMPH ($10^9/L$)	Hemoglobina globular média	MCH (pg)
Percentagem de monócitos	MONO (%)	Concentração de hemoglobina globular média	MCHC (g/dL)
Contagem absoluta de monócitos	MONO ($10^9/L$)	Distribuição do tamanho dos eritrócitos-desvio padrão	RDW-SD (fL)
Percentagem de eosinófilos	EO (%)	Distribuição do tamanho dos eritrócitos –coeficiente de variação	RDW-CV (%)
Contagem absoluta de eosinófilos	EO ($10^9/L$)	Contagem de plaquetas	PLT ($10^9/L$)
Percentagem de basófilos	BASO (%)	Volume plaquetário médio	MPV (fL)
Contagem absoluta de basófilos	BASO ($10^9/L$)	Distribuição do tamanho das plaquetas	PDW (fL)
Percentagem de eritroblastos	NRBC (%)	Percentagem de plaquetas gigantes	P-LCR (%)
Contagem absoluta de eritroblastos	NRBC ($10^9/L$)	Plaquetócrito	PCT (L/L)
Percentagem de reticulócitos	RET (%)	Percentagem de granulócitos imaturos	IG (%)
Contagem absoluta de reticulócitos	RET ($10^9/L$)	Contagem absoluta de granulócitos imaturos	IG ($10^9/L$)
Fracção imatura dos reticulócitos	IRF (%)	Percentagem de células progenitoras hematopoiéticas	HPC (%)
Razão de baixa fluorescência	LRF (%)	Contagem absoluta de células progenitoras hematopoiéticas	HPC ($10^9/L$)
Razão de elevada fluorescência	HRF(%)		

O XE-2100 é constituído por quatro elementos:

- A unidade principal que analisa as amostras e os controlos comerciais;
- A unidade que transporta as amostras em suportes para a unidade de análise;
- O sistema de processamento da informação (que recebe, processa e armazena informaticamente os dados relativos às amostras analisadas);
- Um sistema pneumático que fornece a pressão e vácuo necessários para o correcto funcionamento da unidade principal ³¹.

Metodologia

O XE-2100 usa quatro métodos de determinação distintos:

- Método de detecção por Rádio Frequência/Corrente Directa;
- Método de focagem hidrodinâmica (impedância);
- Citometria de fluxo (usando um *laser* semi-condutor);
- Determinação da concentração da hemoglobina pelo método do lauril-sulfato de sódio (SLS).

A contagem diferencial dos leucócitos utiliza a metodologia convencional de um citómetro de fluxo. A contagem celular é feita através de um *laser* semi-condutor combinando três tipos de informação óptica: dispersão frontal da luz (*forward scatter light* - *FSC*), dispersão lateral da luz (*side scatter light* - *SSC*) e fluorescência lateral ³⁰. A fluorescência lateral é obtida depois de corar as células com um marcador fluorescente de ácidos nucleicos.

Análise dos leucócitos

A partir de uma amostra de sangue são aspirados 200 µL. Deste volume, 18µL de sangue são misturados com 0,882 mL de reagente (*STROMATOLYSER-4DL*). Esta diluição é colocada na câmara de reacção onde são adicionados 18 mL de *STROMATOLYSER-4DS* obtendo-se uma diluição final de 1/51. Após 22 segundos de

reacção os eritrócitos são lisados e os leucócitos são corados. Com a solução resultante procede-se à análise por citometria de fluxo ³¹.

Os leucócitos são apresentados graficamente em quatro populações distintas. Os linfócitos, monócitos, eosinófilos e neutrófilos (+basófilos). Estas populações surgem distribuídas no gráfico *DIFF* que apresenta no eixo das ordenadas a intensidade de fluorescência e no eixo das abcissas a complexidade celular (Figura 3 a). Os basófilos são posteriormente separados dos neutrófilos e surgem representados no gráfico *WBC/BAS* (Figura 3 b).

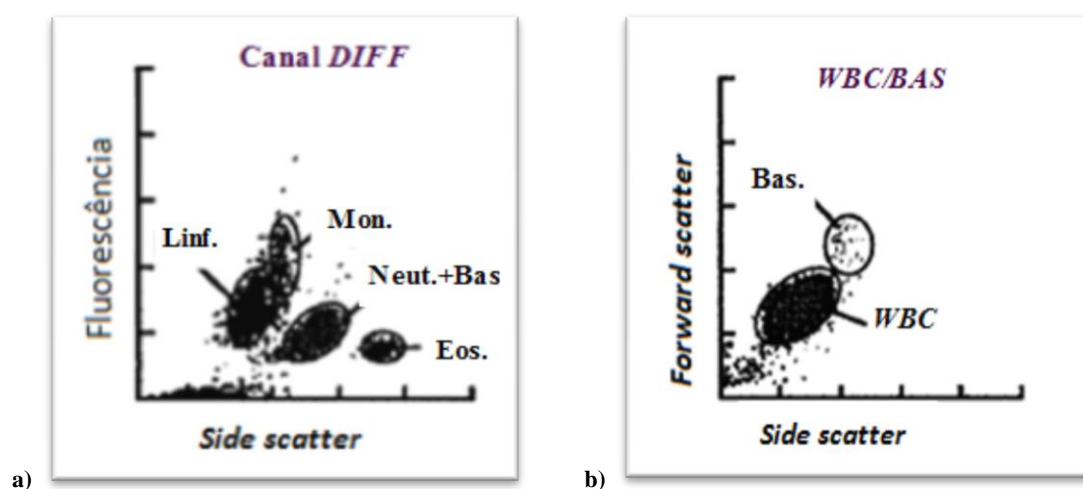


Figura 3 – Representação gráfica da distribuição dos leucócitos obtida com o XE-2100.
a) Canal *DIFF*; b) canal *WBC/BASO*. [Adaptado de Tsuda *et al*, 1999 (28)].

A presença de células anormais é indicada por mensagens de alerta: *Blasts?*, *Immature Gran?*, *Left shift?* *Atypical Lympho?* e *Abn Lympho/ L. Blast?*

Granulócitos Imaturos

O XE-2100 tem a capacidade de contar os granulócitos imaturos (IG). Esta contagem é feita no canal *DIFF* baseada na combinação da coloração fluorescente e dos sinais emitidos pela luz dispersa lateral. Os granulócitos imaturos são apresentados num gráfico e o seu valor é reportado como uma percentagem do valor dos neutrófilos. Quando num hemograma há granulócitos imaturos surge a mensagem *Immature Gran?*. A contagem de IG inclui a contagem de promielócitos, mielócitos e metamielócitos. Os blastos e os neutrófilos em banda estão excluídos desta contagem ³². Briggs *et al* efectuaram um estudo comparativo entre parâmetros hematológicos determinados no

XE-2100 com a contagem manual ³³. No trabalho supra-citado foram utilizadas 465 amostras e a comparação dos dois métodos mostrou um coeficiente de correlação de 0,81 para os IG ³³. Na contagem diferencial apresentada pelo XE-2100, a contagem dos IG é incluída na contagem absoluta de neutrófilos.

PROCESSAMENTO DIGITAL DE IMAGEM

Desde os anos 60 que se verificou um acentuado desenvolvimento dos sistemas automáticos existentes nos laboratórios de Hematologia. Os contadores automáticos dão uma informação sobre a contagem total de leucócitos, o seu diferencial, a série rubra e a contagem de plaquetas. A sua limitação prende-se com a presença de alterações morfológicas e necessidade de caracterização das células imaturas ou anormais. Nestas situações, a visualização do esfregaço sanguíneo por microscopia óptica continua a ser necessária. Isto deve-se, essencialmente, à diversidade de apresentação das células quando estas estão alteradas e à necessidade de avaliação no contexto clínico do doente.

A visualização do esfregaço sanguíneo é um acto diferenciado, que requer pessoal qualificado e aumenta o tempo de resposta.

O número de hemogramas que necessitam ser revistos num laboratório depende de vários factores. Cada centro deve estabelecer as suas regras baseadas nos Consensos Internacionais de Hematologia e adaptadas à sua realidade. Da totalidade dos hemogramas analisados, o número de esfregaços de sangue periférico observados varia entre 10 e 21% ³⁴⁻³⁶.

Nas últimas décadas têm-se investido no desenvolvimento de sistemas automáticos de identificação e classificação das células. O primeiro sistema automático de análise de imagem foi descrito em 1966 por Prewitt e Mendlesohn ³⁵.

Durante os últimos vinte anos surgiram no mercado vários sistemas de processamento e digitalização automática de imagens. Os primeiros sistemas eram lentos e apresentavam dificuldade em classificar as células não normais. Estes sistemas tinham como objectivo uma classificação sistemática das células, de uma forma mais rápida que a visualização manual e com resultados reprodutíveis ³⁵. Estes sistemas apresentam algumas vantagens associadas à sua concepção como o armazenamento de dados, a possibilidade de troca de informação e o ensino através da formação de arquivos de imagem.

CellaVision DM96

Recentemente foi introduzido no mercado um novo sistema de processamento digital de imagens, o CellaVision DM96 TM (CellaVision DM96, *Lund, Sweden*), distribuído na Europa pela *Sysmex Europe*, (Figura 4). O CellaVision foi desenvolvido por uma companhia Sueca fundada em 1994.

O CellaVision DM96 (doravante denominado CellaVision) é um analisador automático de imagem constituído por um microscópio automático com três objectivas (x10, x50, x100), uma câmara digital e um computador que pré-classifica e guarda as imagens das células de um esfregaço de sangue periférico utilizando uma aplicação informática de aquisição e classificação das células (*Blood Differential Software*).

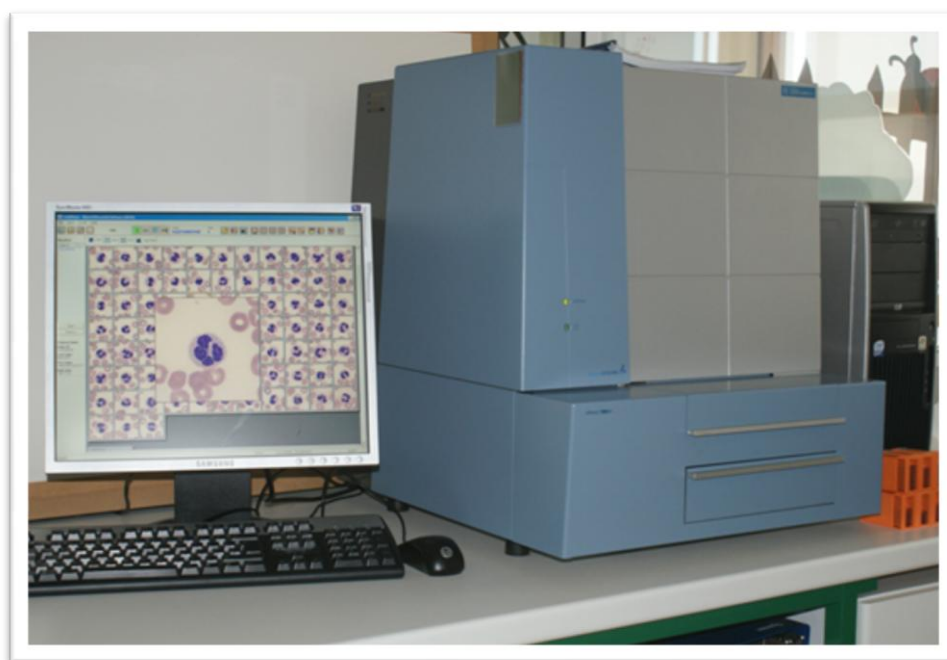


Figura 4 - Sistema de análise de imagem CellaVision DM96

O CellaVision tem capacidade para analisar uma média de 30 esfregaços por hora. As lâminas são identificadas com um código de barras, são introduzidas num suporte que é colocado no sistema e começa a sua análise. Os dados do doente são transmitidos ao CellaVision pelo sistema informático SIS (*Sysmex Information System*) (Figura 7). Cada suporte tem capacidade para doze lâminas. O processo de análise inicia automaticamente. O microscópio robotizado percorre a lâmina em pequena ampliação que detecta a zona óptima para a fotografia e contagem das células. Nessa zona do esfregaço é dispensado o óleo de imersão, o microscópio muda de objectiva, aumenta a ampliação e recolhe imagens digitais (Figura 5).

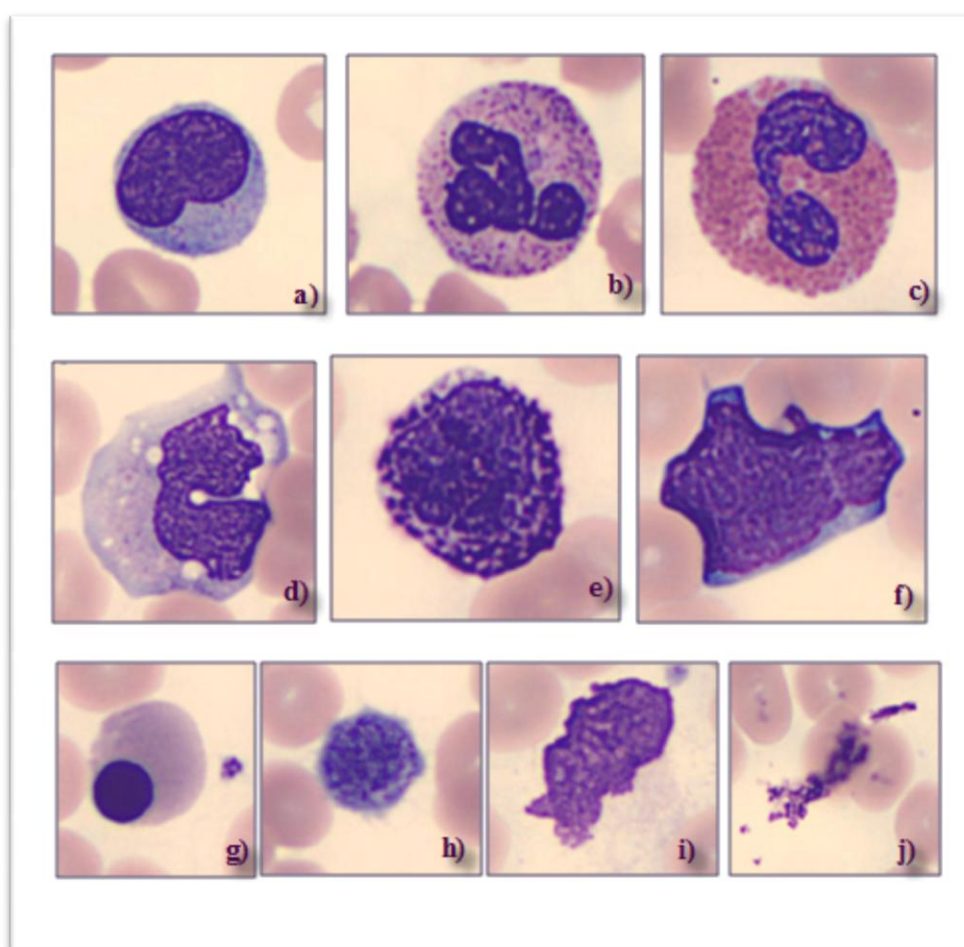


Figura 5 – Exemplos de imagens obtidas no CellaVision. a) linfócito; b) neutrófilo; c) eosinófilo; d) monócito; e) basófilo; f) blasto; g) eritroblasto; h) plaqueta gigante; i) sombra nuclear; j) artefacto.

Estas imagens são processadas por um sistema automático que as compara com uma base de dados existente no sistema, fazendo uma classificação preliminar das células (Figura 6). A aplicação informática associada ao CellaVision transfere as imagens digitais das amostras para os terminais de validação existentes na área de microscopia e validação dos resultados. Quando é necessário, as células são

visualizadas e reclassificadas. Podem ser adicionados comentários à morfologia da série rubra, das plaquetas ou da população leucocitária. Após toda a reclassificação os resultados são validados e disponibilizados no sistema informático do hospital – *Laboratory Information System* (LIS), (Figura 7).

Todos os resultados são armazenados numa base de dados, permitindo a visualização de resultados anteriores de um doente e a possibilidade de comparação das células tornando perceptíveis alterações morfológicas ao longo do tempo.

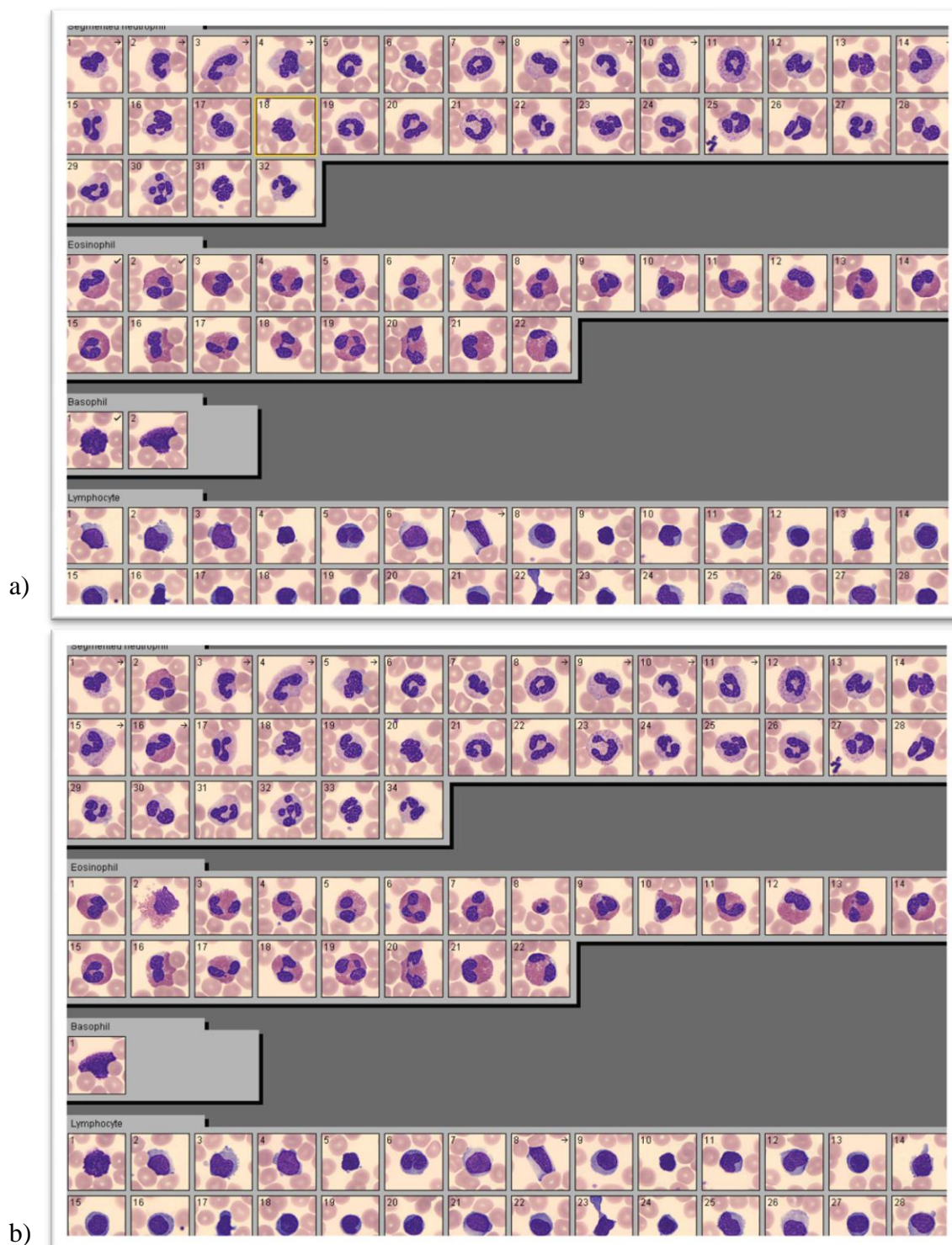


Figura 6 – Resultados obtidos com o Sistema CellaVision DM 96. a) Pré-classificação dos leucócitos; b) Distribuição dos leucócitos após a reclassificação.

Vários trabalhos têm surgido no sentido de demonstrar a utilidade deste sistema na rotina do laboratório de Hematologia³⁴⁻³⁷.

Brigs *et al* avaliaram a precisão e a exatidão do diferencial efectuado pelo CellaVision quando comparado com o método manual³⁵. Neste trabalho, os autores

utilizaram amostras de sangue periférico com valores da contagem total de leucócitos que variavam entre $0,51 \times 10^9/L$ e $73,89 \times 10^9/L$. Os resultados demonstraram uma correlação elevada para os vários tipos de células. No grupo dos linfócitos e dos basófilos estes autores verificaram que os métodos divergiam estatisticamente. Este trabalho também avaliou o tempo médio da análise manual e no CellaVision. Os resultados demonstraram que o CellaVision permitia um ganho no tempo de resposta quando comparado com a contagem manual, salvaguardando a necessidade de alguma experiência no manuseamento do *software* associado ao sistema³⁵.

Em 2007 um grupo francês estudou a utilidade do CellaVision na rotina de um laboratório de Hematologia. Neste trabalho, Cornet *et al* avaliaram a capacidade do CellaVision identificar correctamente as células quando comparado com a contagem manual ou com o contador automático XE-2100³⁶. Avaliaram, ainda, a sensibilidade do microscópio automático para detectar células patológicas. Verificaram que a exatidão encontrada para a contagem dos vários tipos de células foi de 98%, com 2% de falsos negativos para os neutrófilos³⁶.

Estes estudos avaliaram de uma forma global os resultados do hemograma, não havendo informação quanto ao desempenho do sistema em situações especiais, como no caso da leucopenia.

A contagem dos neutrófilos pelos contadores automáticos em situações de leucopenia pode carecer de verificação por microscopia óptica. Esta verificação e a elaboração do respectivo diferencial torna-se muitas vezes impraticável nestes doentes, pela necessidade de procura exaustiva de células no esfregaço, situação que não se adequa à necessidade de resposta em tempo útil que é pedida ao laboratório.

O CellaVision parece ser uma ferramenta útil nestas situações. O microscópio automático faz um varrimento da lâmina e procura um número pré-determinado de leucócitos. As células encontradas são apresentadas no monitor permitindo de uma forma simples a sua visualização e reclassificação. Isto poderá permitir que as situações de neutropenia possam ser quantificadas e reportadas ao clínico de uma forma mais sensível e específica e com a maior brevidade possível.

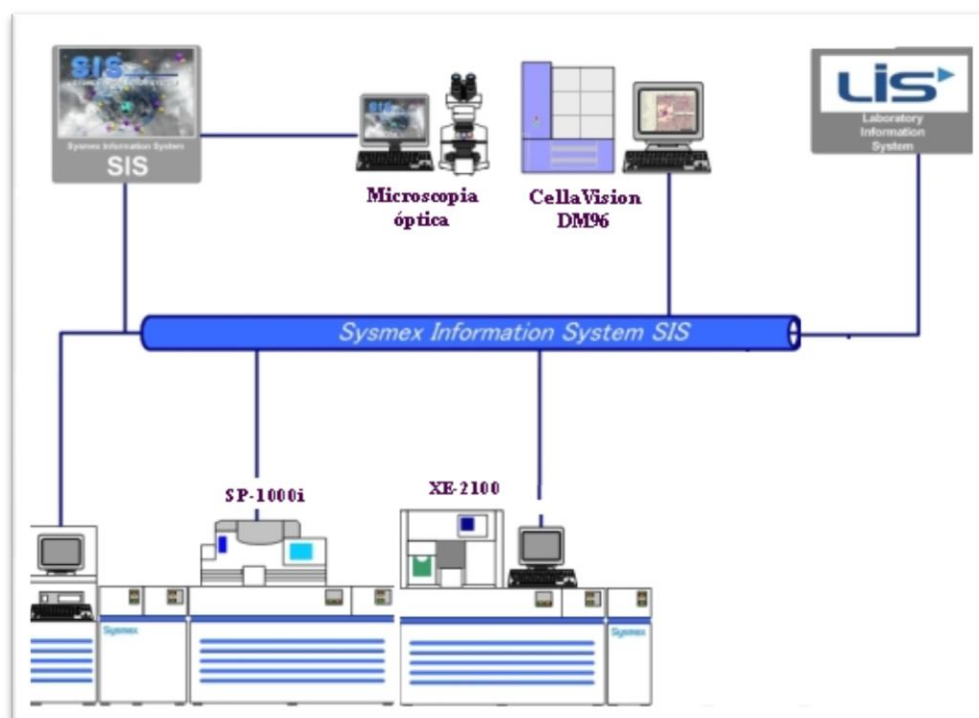


Figura 7 – Laboratório de Hematologia. Representação esquemática da distribuição dos diferentes sistemas de análise e processamento de informação existentes no laboratório. (Adaptado de <http://www.sysmex-europe.com>).

OBJECTIVOS

A contagem diferencial de leucócitos, assim como a contagem absoluta de neutrófilos, é hoje feita de forma automatizada na generalidade dos laboratórios de Hematologia. O número de doentes leucopénicos nos Centros de Oncologia é muito superior ao verificado nos restantes hospitais e instituições de cuidados de saúde primários. A exatidão destes resultados assim como a sua rapidez são de grande importância no estabelecimento da estratégia terapêutica. Assim, a utilização do sistema CellaVision poderia revelar-se de grande interesse nestas circunstâncias.

Atendendo aos poucos estudos efectuados sobre a contagem diferencial de leucócitos em doentes leucopénicos e, a sua importância no contexto oncológico actual, este trabalho teve como principais objectivos:

1. Aferir a acuidade da contagem diferencial de neutrófilos em doentes leucopénicos (definidos como aqueles que apresentam uma contagem total de leucócitos entre $0,1 \times 10^9/L$ e $1,5 \times 10^9/L$) do autoanalisador hematológico XE-2100 Sysmex.
2. Comparação da contagem do diferencial de neutrófilos realizada no autoanalisador hematológico XE-2100 Sysmex e no sistema de análise de imagem CellaVision DM96.
3. Definir o limite inferior da contagem total de leucócitos que permite reportar com confiança o valor de neutrófilos obtido no contador automático XE-2100 Sysmex na rotina diária do laboratório de Hematologia.

MATERIAL E MÉTODOS

AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Neste estudo foram incluídas as amostras de sangue periférico recebidas e processadas no laboratório de Hematologia durante os meses de Junho, Julho e Agosto de 2009, provenientes de vários Serviços do IPO-Porto.

As amostras de sangue periférico foram colhidas em tubos de 2 ou 3 mL, *Vacutainer K3-EDTA (Becton Dickinson, Mountain View, Calif, USA)* e foram analisadas nas 3 horas seguintes à colheita.

CONTAGEM DIFERENCIAL AUTOMÁTICA COM O XE-2100

Após a correcta identificação dos tubos e verificação dos requisitos de qualidade associados ao procedimento laboratorial instituído no Manual da Qualidade, os tubos foram inseridos no autoanalisador XE-2100 que procedeu à sua análise. Os tubos seleccionados, (com alterações e mensagens de erro nos valores do hemograma como referido na pág.17) foram transportados para o sistema de realização e coloração de esfregaços SP1000i *Sysmex*.

REALIZAÇÃO E COLORAÇÃO DOS ESFREGAÇOS

O equipamento SP-1000i está ligado ao XE-2100 por um sistema robotizado. Este módulo faz o esfregaço sanguíneo e cora-o.

Foi utilizada a coloração de *Wright-Giemsa*. Esta coloração foi realizada segundo o protocolo:

1. Pré-fixação com corante *Wright* durante 20 segundos;
2. Secagem durante 5 segundos;
3. Coloração com corante *Wright* durante 4 minutos;
4. Coloração com corante *Wright* diluído 1:10 (Corante *Wright*+água desionizada 9L + tampão Ph 6.9 1L) durante 1 minuto;

5. Coloração com corante *Giemsa* diluído 1:25 (Corante *Giemsa*+água desionizada 9L + tampão Ph 6.9 1L) durante 12 minutos;

6. Lavagem com água desionizada;

7. Secagem durante 8 minutos.

CONTAGEM DIFERENCIAL NO MICROSCÓPIO AUTOMÁTICO

Conforme referido anteriormente, o CellaVision é um microscópio automático. O microscópio percorre a lâmina, identifica as células e fotografa-as. Os resultados são guardados na base de dados do sistema. O CellaVision DM96 pré-classifica as células nos seguintes grupos: neutrófilos (segmentados+banda), eosinófilos, basófilos, monócitos, linfócitos, metamielócitos, mielócitos, promielócitos, blastos, plasmócitos, células atípicas, sombras nucleares, plaquetas gigantes e artefactos.

As sombras nucleares (células danificadas cuja identificação morfológica não é possível), os artefactos e as plaquetas gigantes não foram incluídas na contagem diferencial de leucócitos.

O CellaVision foi programado para fotografar e pré-classificar 200 células. Em muitos destes casos isso não foi possível devido ao reduzido valor de WBC na amostra.

Quando o número de células contadas pelo CellaVision foi inferior a 20 as amostras foram excluídas da análise. De acordo com a bibliografia, pareceu-nos que a reprodutibilidade do diferencial podia ser limitada nestas situações^{22,37}.

O valor da contagem de neutrófilos foi obtido em percentagem da contagem de células efectuada pelo CellaVision.

RECLASSIFICAÇÃO DAS CÉLULAS

A selecção das amostras foi feita a partir da base de dados do sistema CellaVision. Foram seleccionadas as amostras cuja contagem total de leucócitos estava compreendida entre $0,1 \times 10^9/L$ e $1,5 \times 10^9/L$, independentemente dos restantes resultados do hemograma. As amostras para análise foram escolhidas de doentes dos vários Serviços/Departamentos do IPO-Porto, tendo como único critério a contagem total de leucócitos.

As células foram reclassificadas na sala de validação sendo revistas todas as imagens de cada amostra utilizando o *Blood Differential Software*, que está associado ao sistema CellaVision. O operador pode ampliar a imagem das células individualmente para observar pormenores morfológicos (Figura 8). A classificação proposta para cada célula é aceite ou então esta é reclassificada.

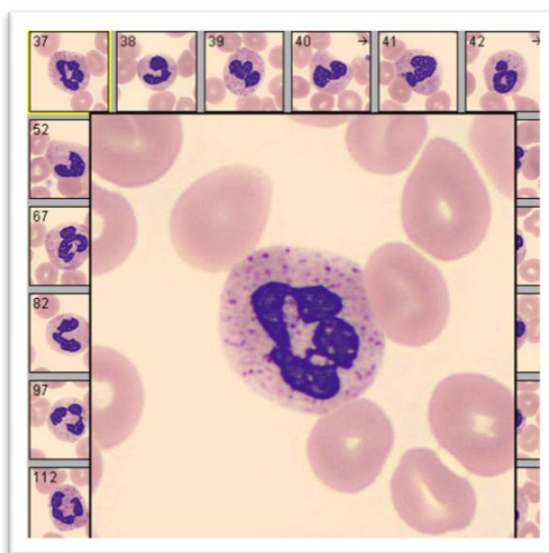


Figura 8 – Imagem ampliada de um neutrófilo.

Para os resultados estarem em conformidade com os que reportamos no nosso laboratório, os neutrófilos em banda foram incluídos na contagem dos neutrófilos.

CÁLCULO DA CONTAGEM ABSOLUTA DE NEUTRÓFILOS

A contagem absoluta de neutrófilos foi calculada a partir da multiplicação do número total de leucócitos obtido no XE-2100 pela percentagem de neutrófilos obtida no CellaVision (N):

$$\text{ANC} = \text{WBC} \times \text{N}$$

Os resultados de ANC e WBC são apresentados em número de células por litro ($\text{nx}10^9/\text{L}$) e os neutrófilos em percentagem (N).

Os resultados obtidos no autoanalisador foram comparados com os resultados obtidos no Sistema CellaVision sendo avaliados vários parâmetros com potencial influência na rapidez de resposta da contagem absoluta de neutrófilos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados previamente registados numa folha de cálculo do *Microsoft Office Excel 2007* foi efectuada utilizando o programa informático SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), versão 18,0 para *Windows*.

O teste t de *Student* para amostras emparelhadas foi utilizado para comparar as diferenças entre médias. O teste de correlação de *Pearson* foi utilizado para a avaliação da correlação entre as variáveis. Foi considerado como estatisticamente significativo um valor de p inferior a 0,05 ($p < 0,05$).

RESULTADOS

AMOSTRAS BIOLÓGICAS

No período do estudo foram analisados na rotina do laboratório um total de 17117 hemogramas. Estes hemogramas foram provenientes dos vários Serviços do IPO-Porto e foram identificados e registados no sistema informático do laboratório.

CONTAGEM DIFERENCIAL AUTOMÁTICA COM O XE-2100

Do total de hemogramas analisados, 1233 apresentavam uma contagem total de leucócitos compreendida entre 0,1 e $1,5 \times 10^9/L$. Este valor corresponde a 7,2% dos hemogramas processados no laboratório no período do estudo.

CONTAGEM DIFERENCIAL NO MICROSCÓPIO AUTOMÁTICO

Dos 17117 hemogramas, 3150 foram analisados no CellaVision. Destes casos, 267 encontravam-se nas condições definidas para o estudo (8,5%). A distribuição das amostras pelos diferentes serviços está apresentada na Tabela V.

Tabela V – Distribuição das amostras pelos serviços requisitantes

Serviços	Nº Hemogramas
Onco-hematologia	114
Pediatria	72
STMO	38
Outros	43

Em 19 (7,1%) das 267 amostras o XE-2100 apresentou erro na contagem diferencial. Nestas situações, o analisador automático dá informação da contagem total de leucócitos mas não apresenta resultado da contagem diferencial. Na Figura 9 está representada uma amostra com contagem total de leucócitos de $0,27 \times 10^9/L$, sem contagem diferencial de células. Estes hemogramas seriam candidatos naturais a análise no CellaVision.

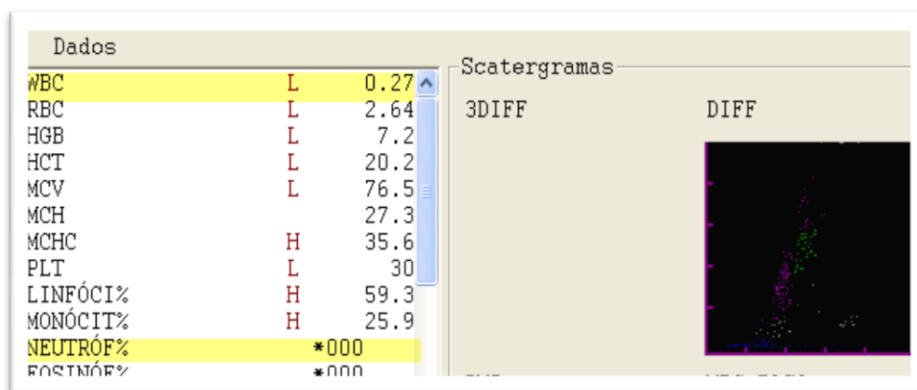


Figura 9 – Amostra com erro na contagem diferencial de leucócitos no XE-2100. (WBC = $0,27 \times 10^9/L$)

Conforme referido anteriormente, o CellaVision foi programado para fotografar e pré-classificar 200 células. Em muitos destes casos isso não foi possível devido ao valor baixo de WBC. Na Tabela VI está representada a distribuição das amostras pelo número de células analisadas.

Tabela VI - Número de células analisadas para fazer a contagem de leucócitos utilizando o CellaVision DM96. Apenas as células classificadas como leucócitos foram incluídas na análise.

Número de células analisadas pelo CellaVision (n)	<20	20-100	101-200	>200
Número de amostras	20	109	100	38
%	7,5	40,8	37,5	14,2

O número de casos com menos de 20 células encontradas pelo CellaVision foi de 20 dos 267 casos estudados (7,5%). Dos 19 resultados com erro de leitura no XE-2100, foi possível obter o ANC no CellaVision em 16 (84%), os restantes apresentaram menos de 20 células no CellaVision.

Na Figura 10 está representado um caso em que o CellaVision apenas fotografou seis células.

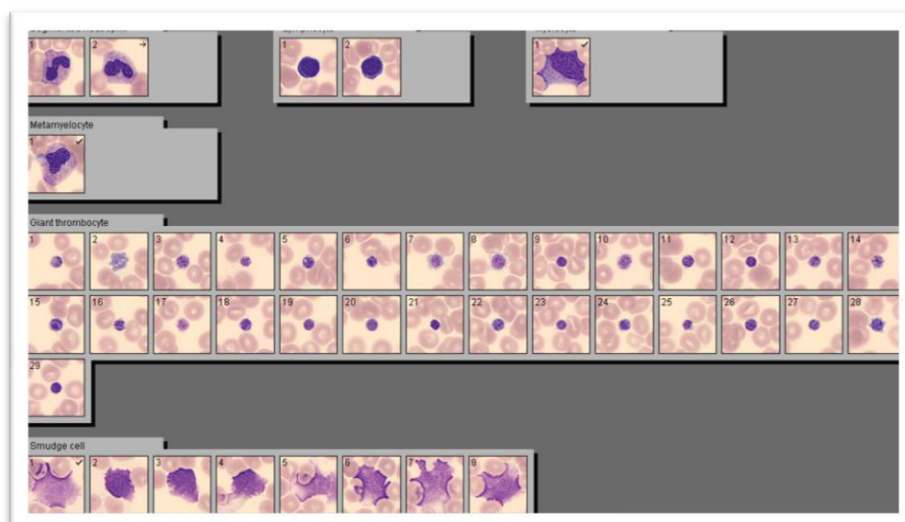


Figura 10 – Amostra excluída do estudo por contagem insuficiente de células pelo CellaVision

RECLASSIFICAÇÃO DAS CÉLULAS

A classificação preliminar feita pelo CellaVision foi revista em todos os casos, num total de 30 953 células.

Nas figuras seguintes estão apresentados dois dos casos estudados.

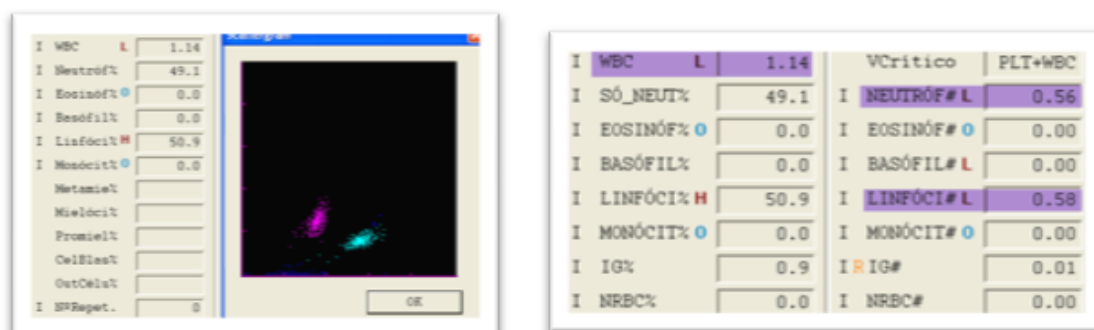


Figura 11 – Resultado do hemograma efectuado no XE-2100 (WBC- $1.14 \times 10^9/L$)

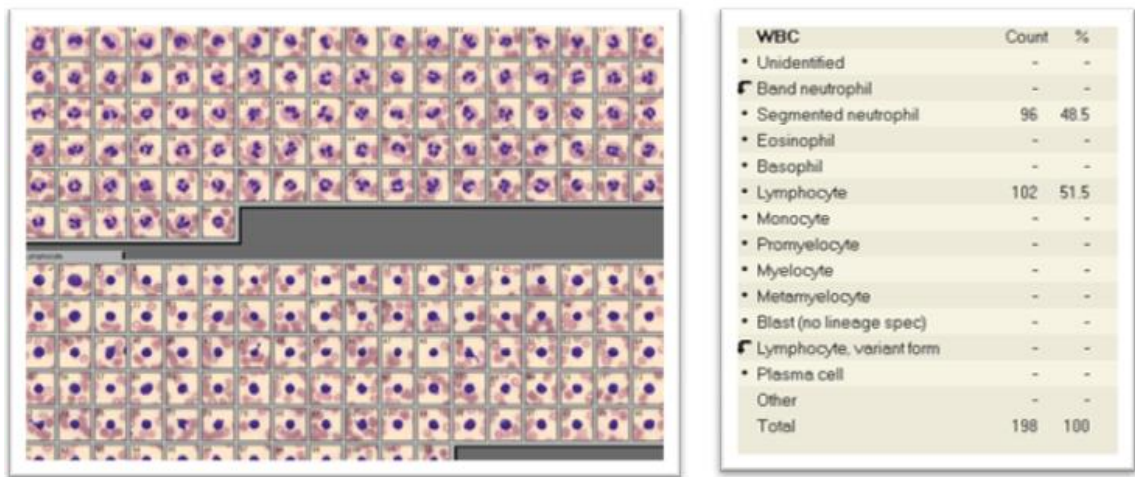


Figura 12 – Análise efectuada com o CellaVision. (Contagem e classificação dos neutrófilos do hemograma apresentado na figura anterior)

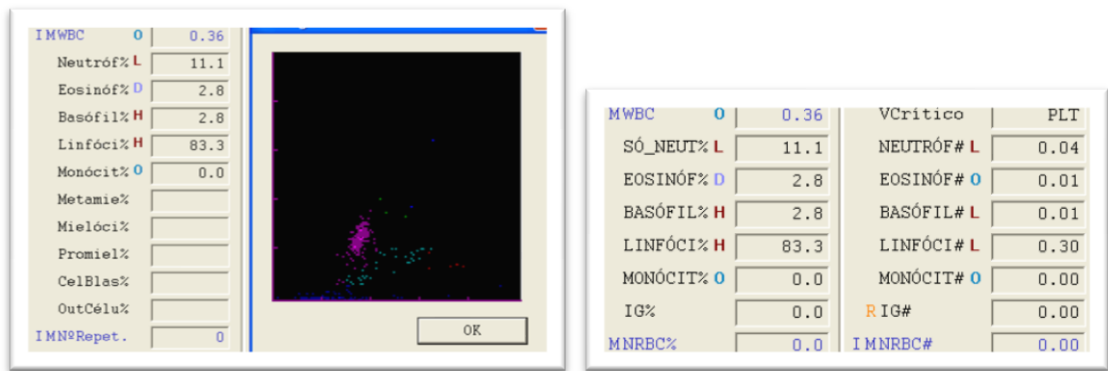


Figura 13 - Hemograma analisado no XE-2100 (WBC-0,36x10⁹/L)

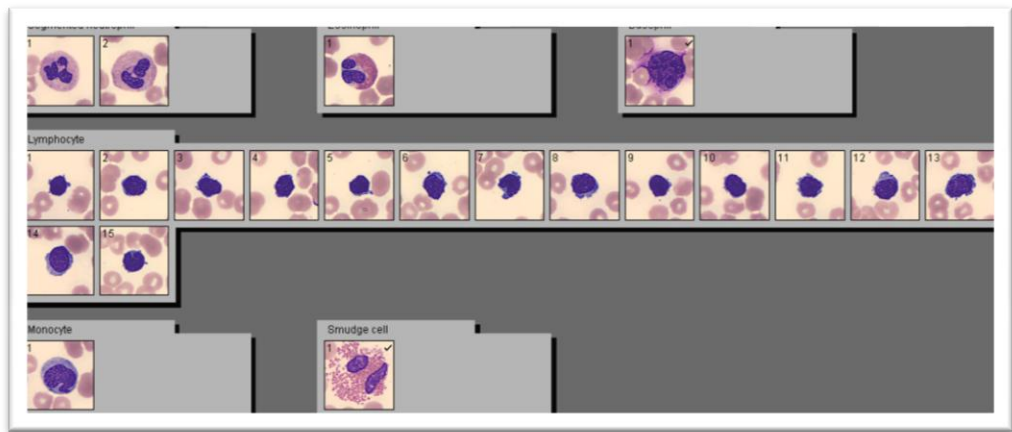


Figura 14 - Análise efectuada com o CellaVision do hemograma da figura anterior. (Contagem e classificação dos neutrófilos do hemograma apresentado na figura anterior)

<u>WBC</u>	<u>Count</u>	<u>%</u>	<u>Concentration (x10e9/L)</u>
Segmented neutrophil	2	10.0	0.04
Eosinophil	1	5.0	0.02
Basophil	1	5.0	0.02
Lymphocyte	15	75.0	0.27
Monocyte	1	5.0	0.02
total:	20		
<hr/>			
<u>Ion-WBC</u>	<u>Count</u>	<u>% (count / total WBC)</u>	
Smudge cell	1	5.0	
Artefact	45	225.0	

**Figura 15 – Relatório efectuado pelo CellaVision.
(ANC e distribuição percentual das diferentes células)**

ANÁLISE COMPARATIVA DO DESEMPENHO DO ANALISADOR AUTOMÁTICO XE-2100 E DO SISTEMA DE ANÁLISE DE IMAGEM CELLAVISION DM 96

O intervalo de WBC em estudo compreendeu amostras entre 0,1 e 1,5 célulasx10⁹/L. Quando comparamos o valor absoluto dos neutrófilos determinado pelo analisador automático XE-2100 e pelo sistema de análise de imagem CellaVision DM96, podemos verificar que a diferença das médias não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$), (Figura 16).

O teste t de *Student* para amostras emparelhadas foi utilizado para comparar as diferenças entre médias.

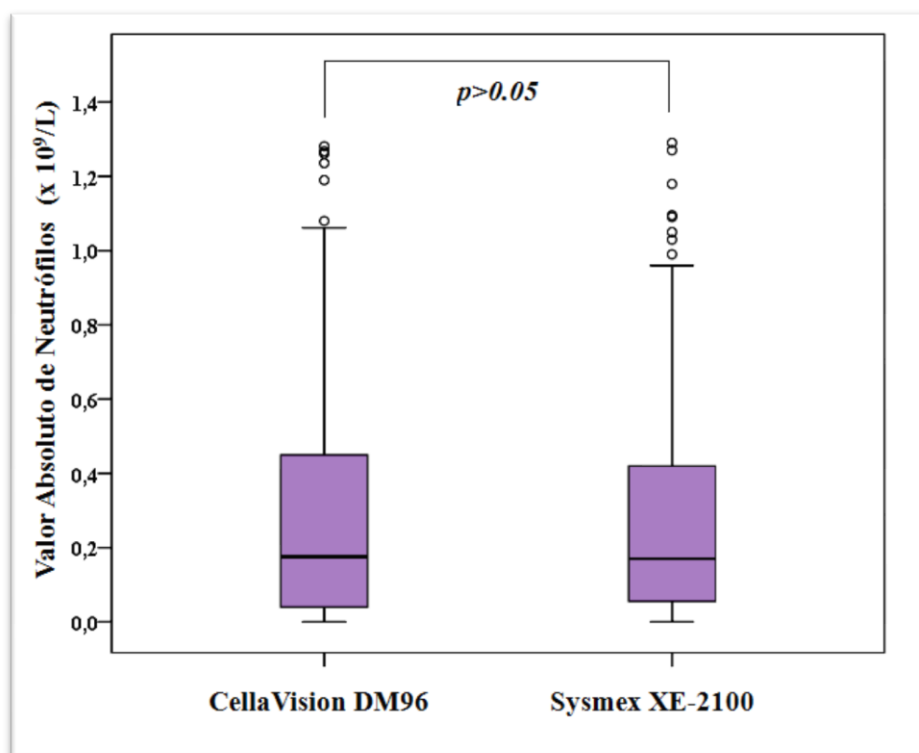


Figura 16 – Box-plot comparativo da distribuição das contagens absolutas de neutrófilos nos dois sistemas.

O teste de correlação de *Pearson* foi utilizado para a avaliação da correlação entre as variáveis. O gráfico da Figura 17 representa a correlação entre a contagem de neutrófilos efectuada pelos dois sistemas.

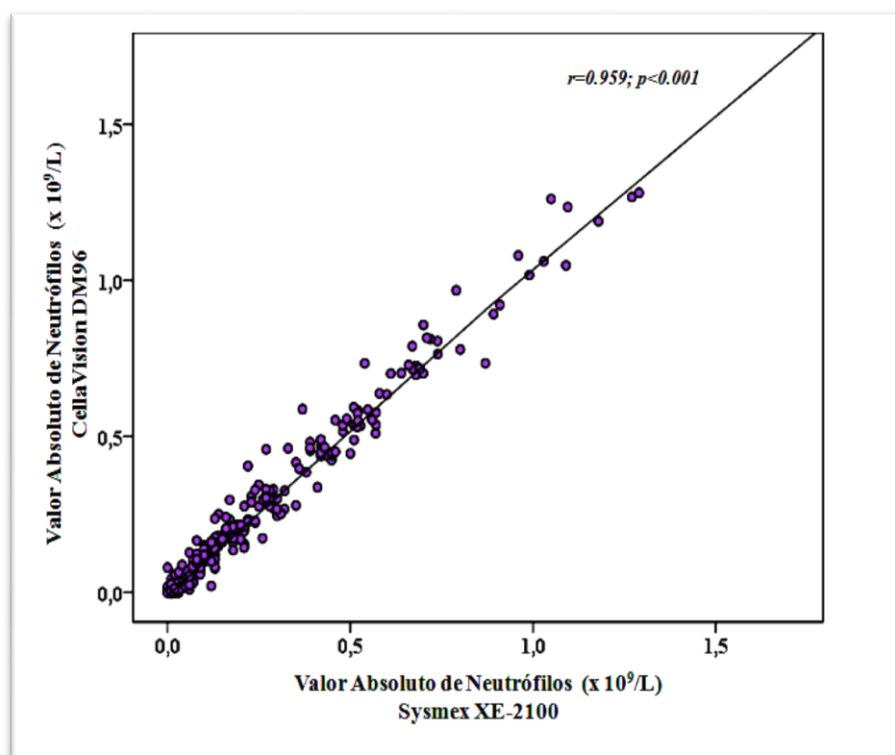


Figura 17 – Representação gráfica da correlação do valor absoluto dos neutrófilos avaliado pelos dois sistemas.

Conforme está patente na Figura 17, o índice de correlação foi elevado (0,959), sendo estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

Seguidamente, foi avaliada em detalhe a mesma correlação, em função da contagem absoluta de leucócitos, agrupada em conjuntos de amostras definidos pelos percentis da distribuição conforme consta da Tabela VII e Figura 18.

Tabela VII – Valor de WBC ($\times 10^9/L$) nos diferentes percentis de distribuição

Percentil	WBC ($\times 10^9/L$)
25	0,35
50	0,68
75	1,02

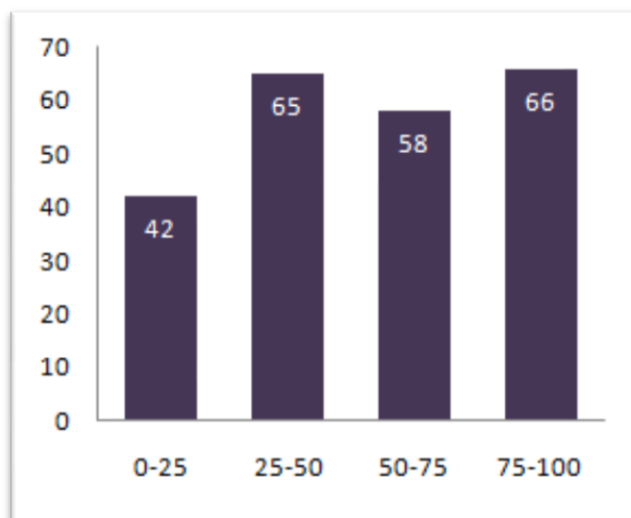


Figura 18 – Distribuição das amostras de acordo com os intervalos interpercentil (n=231)

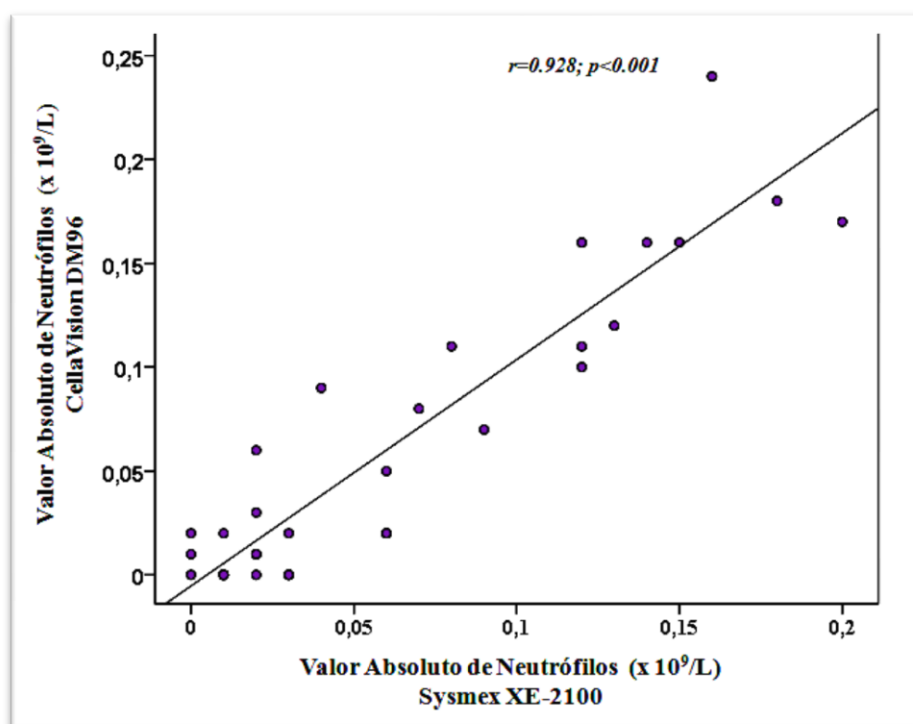


Figura 19 – Representação gráfica da correlação do valor absoluto dos neutrófilos avaliado pelos dois sistemas para amostras com valor de WBC inferior ao percentil 25 (n=42).

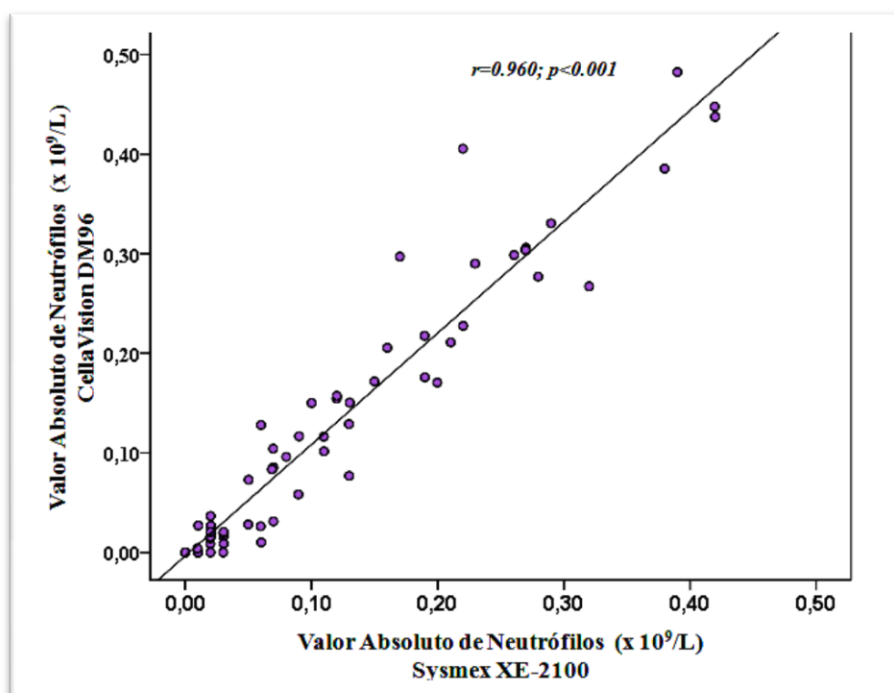


Figura 20 – Representação gráfica da correlação do valor absoluto dos neutrófilos avaliado pelos dois sistemas para amostras com valor de WBC compreendidas entre o percentil 25 e 50 (n=65).

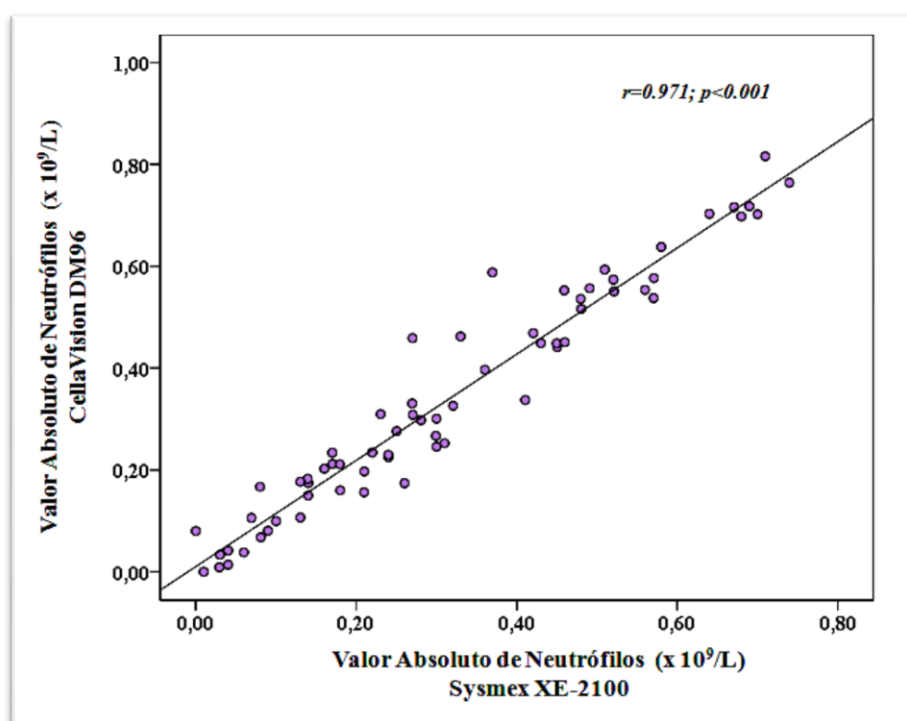


Figura 21 – Representação gráfica da correlação do valor absoluto dos neutrófilos avaliado pelos dois sistemas para amostras com valor de WBC compreendidas entre o percentil 50 e 75 (n=58).

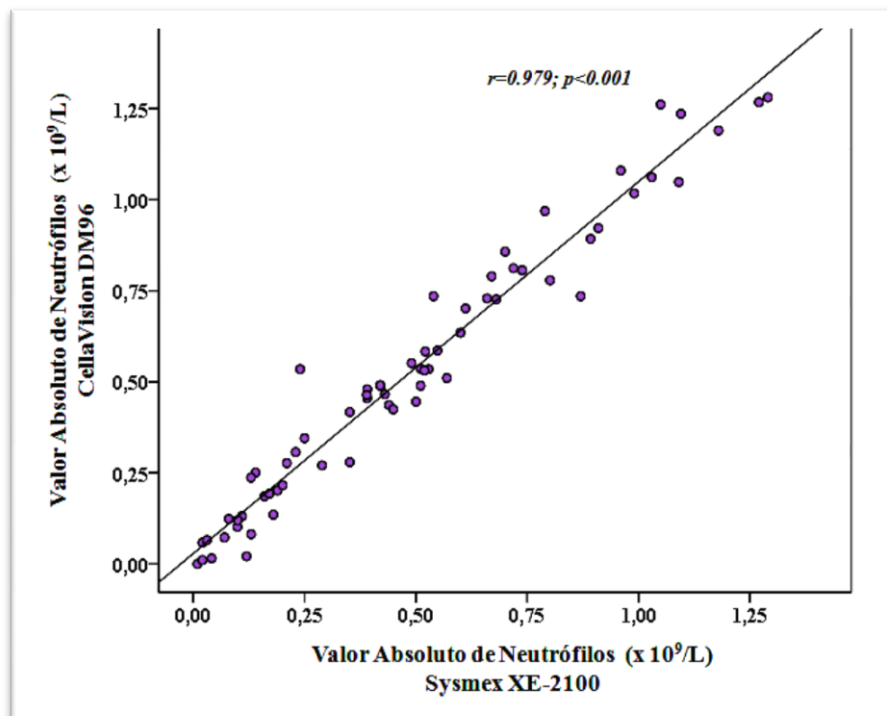


Figura 22 – Representação gráfica da correlação do valor absoluto dos neutrófilos avaliado pelos dois sistemas para amostras com valor de WBC superior ao percentil 75 (n=66).

Como seria expectável, o índice de correlação incrementou à medida que o número de leucócitos aumentou, tendo sido sempre superior a 0,9 e estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

DISCUSSÃO

Actualmente, a contagem total e diferencial de leucócitos nos laboratórios de Hematologia está automatizada. No entanto, a análise microscópica do esfregaço de sangue periférico continua a ser indispensável em diversas situações, uma vez que os analisadores automáticos são incapazes de fazer uma análise da morfologia dos leucócitos, dos eritrócitos e das plaquetas. A análise por microscopia óptica continua a ser, por esse motivo, o método de referência para a contagem diferencial de leucócitos num esfregaço de sangue periférico ³⁴.

Contudo, a análise por microscopia óptica aumenta o tempo de resposta do laboratório quando comparado com o tempo de análise pelos contadores automáticos. Além disso, requer pessoas qualificadas e com experiência em morfologia, o que aumenta os custos. Assim, a contagem de células em situações de leucopenia torna-se muitas vezes impraticável por microscopia óptica, pelo que a utilização de sistemas de análise de imagem poderá, nestas situações, ter um papel muito importante. Este sistema faz automaticamente a procura das células disponibilizando-as num monitor de uma forma rápida, sendo então, sujeitas à avaliação morfológica especializada.

Por esse motivo, avaliámos, neste estudo, dois sistemas capazes de fazer a contagem diferencial de leucócitos e obter a contagem absoluta de neutrófilos existentes no sangue periférico, num contexto em que esta determinação é de particular significado clínico: o doente leucopénico.

Os estudos efectuados sobre a contagem diferencial de leucócitos em doentes leucopénicos são escassos. Provavelmente, isto deve-se à particularidade desta situação mesmo em meio hospitalar. No entanto, no contexto da patologia oncológica, a incidência da leucopenia associada à terapêutica apresenta valores que podem atingir os 33% ¹⁷. Nos centros oncológicos, muitas das decisões diárias na clínica médica estão dependentes do valor de leucócitos e, mais particularmente, do valor da contagem absoluta de neutrófilos. Assim, um dos objectivos deste trabalho foi avaliar a metodologia de contagem de neutrófilos em doentes leucopénicos (contagem total de leucócitos entre $0,1 \times 10^9/L$ e $1,5 \times 10^9/L$). Nestes doentes, fomos comparar a contagem de neutrófilos realizada no autoanalisador hematológico XE-2100 Sysmex com a contagem de neutrófilos no sistema de análise de imagem CellaVision DM96. Um objectivo

adicional do trabalho foi estabelecer o limite mínimo da confiança para reportar o valor de neutrófilos obtido no contador automático XE-2100 Sysmex na rotina diária do laboratório de Hematologia.

Durante o período analisado, o número de hemogramas com contagem de leucócitos entre $0,1$ e $1,5 \times 10^9/L$ representou, aproximadamente, 7,2% das análises realizadas diariamente no nosso laboratório. Neste estudo, foram seleccionadas as amostras cujo valor de leucócitos se encontravam no intervalo referido e que tinham sido processadas pelo CellaVision. Assim, num total de 3150 amostras com neutropenia, 267 (8,5%) foram também avaliadas no CellaVision, encontrando-se desta forma dentro dos critérios de inclusão. Neste contexto, a selecção parece ser representativa da quantidade de doentes leucopénicos cujos hemogramas são analisados diariamente no laboratório de Hematologia, não parecendo verificar-se, portanto, um enviesamento na selecção da amostra.

Relativamente à distribuição da amostra pelos serviços requisitantes, podemos verificar que os hemogramas provenientes dos Serviços de Hemato-oncologia ($n=114$), Pediatria ($n=72$) e Transplantação de Medula Óssea ($n=38$) apresentam um claro predomínio. Esta situação está de acordo com o que seria expectável no contexto das neoplasias/procedimentos que lhes estão associados, pois é nesses serviços que se tratam os doentes do foro hemato-oncológico, sendo estes tratamentos a principal causa do desenvolvimento de neutropenia.

Indirectamente, este resultado corrobora que a mielossupressão associada à terapêutica hemato-oncológica é muito superior à verificada quando se está a tratar uma neoplasia de outra natureza.

Embora no Serviço de Pediatria sejam tratados diversos tipos de neoplasias, quer hematológicas quer de outra natureza, optámos por não estratificar a nossa amostra por patologias, atendendo à sua reduzida dimensão, que não permitiria a retirada de conclusões significativas. Contudo, no estudo realizado com 74 crianças pelo grupo de Bash *et al* para avaliar a possibilidade de a neutropenia ser tratada em ambulatório, 52 doentes apresentavam tumores hematológicos e 22 tumores sólidos ¹⁵, uma vez mais realçando o efeito leucopénico mais pronunciado na terapêutica de doenças hemato-oncológicas.

Já no que concerne ao Serviço de Transplantação de Medula Óssea, a mielossupressão é um procedimento que antecede a transplantação e, desta forma, a leucopenia é uma situação que lhe está inerente e cuja frequência é naturalmente elevada.

A leucopenia e a neutropenia são parâmetros avaliados laboratorialmente no Serviço de Patologia Clínica, mais especificamente no laboratório de Hematologia. Está definido nas normas do laboratório de Hematologia do IPO-Porto, que o processamento do hemograma seja realizado no contador hematológico Sysmex XE-2100 como abordagem padrão. O desempenho deste analisador está bem descrito em alguns trabalhos encontrados na literatura. Um estudo elaborado por Tsuda *et al* apresenta uma avaliação deste contador relativamente à reprodutibilidade, contaminação entre amostras (*carryover*), estabilidade das mesmas (a 4°C e à temperatura ambiente) e precisão dos resultados. Neste trabalho, a contagem diferencial de leucócitos foi comparada com o contador automático Sysmex SE-9000 e com a contagem manual. O estudo de correlação foi feito em 210 amostras ($WBC > 3,3 \times 10^9/L$) e mostrou uma correlação superior a 90% para os neutrófilos, linfócitos e eosinófilos²⁸. No trabalho de Ruzicka *et al* foi avaliado o desempenho do XE-2100 relativamente à contagem diferencial de leucócitos, comparativamente com a contagem manual e com outro analisador da Sysmex, o NE-8000. Neste estudo, que utilizou 544 amostras de sangue total, os autores encontraram uma boa correlação entre a contagem manual e o XE-2100. Os coeficientes de correlação para os neutrófilos ($r=0,925$), linfócitos ($r=0,922$) monócitos ($r=0,756$), eosinófilos ($r=0,877$) e basófilos ($r=0,763$) foram melhores para o XE-2100 do que para o NE-8000. No entanto, os mesmos autores referem que para amostras com $WBC < 4,0 \times 10^9/L$ a sensibilidade de emissão de alarmes estará diminuída³⁰. Neste estudo, contudo, não foram apresentados os resultados em função da distribuição de WBC.

Os estudos encontrados na literatura indicam, portanto, um bom desempenho do contador hematológico XE-2100, contudo, as amostras com leucopenia estão pouco representadas. Isto pode dever-se, por um lado, à escassez destas fora do contexto neoplásico e por outro lado, ao facto de a contagem diferencial por microscopia óptica destes hemogramas apresentar algumas dificuldades, o que de alguma forma pode inviabilizar ou dificultar este tipo de estudos.

Neste contexto, o processamento digital de imagem permite que as células sejam localizadas num esfregaço de sangue sem a intervenção do operador. Quando estamos perante doentes leucopénicos esta pode ser uma boa alternativa à procura exaustiva das células, dado que a sua escassez torna a procura e contagem manual uma tarefa penosa e demorada. Foi neste sentido que avaliámos as capacidades do microscópio automático CellaVision DM 96, e a sua potencial relevância num Centro de Oncologia.

Previamente, Brigs *et al* propuseram a substituição da análise da contagem diferencial de leucócitos efectuada por microscopia óptica pela avaliação elaborada pelo CellaVision na rotina do laboratório ³⁵. Neste trabalho, utilizaram 136 amostras das quais 45 não apresentavam alterações hematológicas. As restantes amostras manifestavam alterações nas populações dos leucócitos e/ou da série rubra. Todas as amostras incluídas neste estudo foram previamente analisadas no contador automático XE-2100 e a distribuição de WBC estava compreendida entre $0,51 \times 10^9/L$ e $73,89 \times 10^9/L$. Os autores avaliaram o desempenho do CellaVision antes e depois da reclassificação das células. No caso dos neutrófilos, o sistema apresentou uma concordância de 95,0% com a contagem manual. Após a reclassificação, os coeficientes de correlação aumentaram. O coeficiente de correlação após a reclassificação dos neutrófilos foi de 0,9859 ³⁵.

Em 2008, o grupo coordenado por Cornet avaliou o desempenho do CellaVision no âmbito de doenças do foro hematológico ³⁶. Neste estudo, foram analisadas as amostras de 440 doentes e comparadas com o XE-2100 e/ou com a contagem manual. Todas as amostras apresentavam alterações hematológicas, 84 das quais eram provenientes de indivíduos com neoplasias hematológicas. Depois da reclassificação das células, a contagem de neutrófilos apresentou uma concordância de 98% ³⁶.

Globalmente, os trabalhos atrás referidos indicam que os sistemas de contagem utilizados têm um bom desempenho e estarão aptos a cumprir as solicitações gerais de uma unidade hospitalar. Contudo, existe uma escassez de dados relativos ao mesmo desempenho no contexto específico da leucopenia, facto que motivou o nosso trabalho. De facto, na maioria dos laboratórios de Hematologia, mesmo em Hospitais Centrais, a frequência de doentes leucopénicos é baixa. Assim, quando um laboratório está perante uma amostra de um doente leucopénico enfrenta diversos problemas. A contagem manual muitas vezes não é exequível e como os estudos que avaliam o desempenho dos

contadores automáticos não incidem neste tipo de amostras não existem dados suficientes para ajuizar da precisão da contagem automática. Consequentemente, a validação dos resultados nestes doentes tem sempre associada alguma incerteza.

Assim, no presente estudo, que apenas se baseou em doentes leucopénicos, verificamos que a contagem de neutrófilos efectuada pelo analisador automático XE-2100 para valores de leucócitos situados entre $0,1 \times 10^9$ e $1,5 \times 10^9/L$, apresenta um coeficiente de correlação elevado ($r=0,959$, $p < 0,001$) quando comparado com a contagem efectuada no CellaVision. É importante referir que esta análise foi realizada em amostras emparelhadas o que reforça a sua validade. Este resultado significa que neste intervalo de WBC, a resposta fornecida por ambos os sistemas é, globalmente, equivalente e indica que o resultado do contador automático poderá ser validado com um grau de certeza bastante elevado.

Por outro lado, ao verificarmos que nas situações de leucopenia o coeficiente de correlação determinado no nosso estudo é muito sobreponível ao encontrado na literatura, podemos concluir que a avaliação automática constitui uma abordagem adequada no contexto de uma unidade hospitalar generalista. É de ressaltar que este aspecto nunca foi estudado previamente.

Actualmente, no nosso laboratório, a informação relativa à contagem de neutrófilos só é reportada ao médico para valores de $WBC > 0,5 \times 10^9/L$. Por esse motivo, o nosso estudo pretendeu também avaliar o desempenho comparativo dos dois sistemas, estratificado de acordo com a distribuição da amostra. Para este fim, analisámos separadamente o índice de correlação ao longo de distribuição e valores, utilizando os percentis 25, 50 e 75 como limites de intervalo de análise. Globalmente, os índices de correlação foram bastante elevados (sempre superiores a 92%) e muito significativos do ponto de vista estatístico. De facto, embora as médias para cada intervalo apresentem ligeiras diferenças, estas não se relevaram significativas do ponto de vista estatístico. Obviamente, foi no extremo inferior da distribuição que observamos o valor mais baixo para este índice, o que é perfeitamente expectável sob o ponto de vista estatístico. Igualmente, os valores mais elevados foram identificados no extremo superior da distribuição, sendo importante notar que houve um incremento gradual e contínuo ao longo dos intervalos analisados. Assim, consideramos que estes resultados permitem propor uma alteração da nossa rotina de trabalho, de forma a relatar o valor da contagem

absoluta de neutrófilos, mesmo para valores de WBC compreendidos entre 0,1 e $0,5 \times 10^9/L$. Esta alteração poderá ser de grande utilidade clínica dado que somos, por vezes, confrontados com pedidos de informação mais detalhada da contagem para valores de $WBC < 0,5 \times 10^9/L$, com o argumento de que esta informação permitirá decidir de forma mais adequada a estratégia terapêutica.

Como nota final, é de realçar que o arquivo de informação através de imagens é de grande importância num hospital. O hematologista pode, através de imagens digitais, avaliar a evolução de um doente ou utilizar as imagens como referência em situações posteriores. Um especialista de laboratório também pode utilizar estas imagens em diversos contextos, nomeadamente formação e ensino na área da morfologia. Com a introdução no laboratório do CellaVision torna-se possível a existência de um arquivo de imagens de fácil acesso, podendo estas ser guardadas, revistas e comparadas ao longo do tempo.

CONCLUSÃO/PERSPECTIVAS FUTURAS

Com este estudo concluímos que, em doentes leucopénicos, podemos reportar com confiança o valor dos neutrófilos obtido no contador hematológico automático XE-2100. Uma das vantagens que isto traz é a diminuição no tempo de resposta pois, em muitas situações, a única informação que o médico precisa relativamente ao diferencial do hemograma é o número absoluto de neutrófilos. Com a actual importância que a neutropenia representa nas instituições que tratam o cancro, parece-nos que o facto de aumentarmos a informação que o laboratório pode dar e a rapidez de resposta constituem mais-valias para o doente.

Pese embora todas as vantagens encontradas no CellaVision, a sua utilização fica algo limitada em termos de tempo de resposta quando comparado com os autoanalísadores. Contudo, é um avanço em relação à contagem manual no contexto específico de um centro de oncologia. Nestes hospitais fará sentido um equipamento desta natureza.

Finalmente, os resultados apresentados, fornecem uma base científica para reavaliar o procedimento actualmente existente na rotina laboratorial da nossa instituição quanto ao relato de contagem de neutrófilos nos casos de $WBC < 0,5 \times 10^9/L$, o que trará um acréscimo de informação relevante em diversas situações clínicas.

Como perspectiva de trabalhos futuros, antevemos como de grande potencial de impacto clínico a mesma avaliação relativamente à contagem absoluta de monócitos, pois no contexto da literatura actual, esta contagem parece ter uma grande importância na avaliação de resposta às infecções em doentes que apresentam neutropenia.

BIBLIOGRAFIA

1. **Burmester G R, Pezzutto A.** *Imunologia Texto e Atlas*. [trad.] J. A. Falcato. Lisboa: Lidel; 2005.
2. **Parslow T G, Stites T G , Terr P D, et al.** *Medical Immunology*. 20th Edition. USA: McGraw-Hill; 2001.
3. **Cardoso E M.** Células e Órgãos do Sistema Imunológico. In A. F. Arosa, M. E. Cardoso e C. F. Pacheco. *Fundamentos de Imunologia*. Lisboa: Lidel; 2007.
4. **Arosa A F, Cardoso M E, Pacheco C F.** *Fundamentos de Imunologia*. Lisboa: Lidel; 2007.
5. **Hofbrand A V, Catovsky D, Tuddenham E G.** *Postgraduate Haematology*. Fifth edition. Oxford: Blackwell Publishing; 2005.
6. **Bain B J.** *Blood Cells: A Practical Guide*. Fourth Edition. Oxford: Blackwell Publishing; 2006.
7. **Hoffbrand A V, Moss P A, Pettit I E.** *Essential Haematology*. Fifth edition. Oxford: Blackwell Publishing; 2005.
8. **Ciesla B.** *Hematology in Practice*. Philadelphia: F. A. Davis Company; 2007.
9. **Kindt T J, Richard A G, Osborne A B.** *Immunology*. 6th Edition. New York: W. H. Freeman and Company; 2007.
10. **Santos E C.** Imunodeficiências. In A. F. Arosa, M. E. Cardoso e C. F. Pacheco. *Fundamentos de Imunologia*. Lisboa: Lidel; 2007. pp 211-235.
11. **Parham P.** *O Sistema Imune*. [trad.] Ane Rose Bolner. Porto Alegre: Artmed Editora; 2001.
12. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE, versão 3,0).. http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/docs/ctaev3.pdf 2006. Consultado em 15 de Fevereiro de 2011.

13. **Aapro M, Crafword J, Kamioner D.** Prophylaxis of chemotherapy-induced febrile neutropenia with granulocyte colony-stimulating factors: where are we now? *Support Care Cancer*. 2010;18:529-541.

14. **Marti M F, Cullen M H, Rolla F.** Management of febrile neutropenia: ESMO Clinical recommendations. *Ann of Oncol*. 2009; 20:iv166-iv169..

15. **Bash R O, Katz J A, Cash J V, et al.** Safety and cost Effectiveness of Early Hospital Discharge of Lower Risk Children with Cancer Admitted for Fever and Neutropenia. *Cancer*. 1994; 74:189-196.

16. **Aapro M S, Bohlius J, Cameron D A, et al.** 2010 update of EORTC guidelines for the use of granulocyte-colony stimulating factor to reduce the incidence of chemotherapy-induced febrile neutropenia in adult patients with lymphoproliferative disorders and solid tumours. *EJC*. 2011; 47:8-32.

17. **Moreau M, Klastersky J, Schwarzbald A, et al.** A general chemotherapy myelotoxicity score to predict febrile neutropenia in hematological malignancies. *Ann Onc*. 2009;20:513-519.

18. **Bodey G P, Buckley M, Sathe Y S, Freireich E J.** Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann. Intern. Med*. 1966;64:328-340.

19. **Schimpff S, Satterlee W, Young M V, et al.** Empiric Therapy with Carbenicillin and Gentamicin for Febrile Patients with Cancer and Granulocytopenia. *N Engl J Med*. 1971;284:1061-1065.

20. **Sung L, Jonhston D L.** Approach to febrile neutropenia in the general paediatric setting. *Paediatr Child Health*. 2007;12:19-21.

21. **Smith T J, Khatcheressian J, Lyman G H, et al.** 2006 update of recommendations for use of with blood cell grow factors: an evidence-based clinical practice guideline. *J Clin Oncol* 2006;24:2975-2977.

22. **Saegeman V, Driessche M e Moerman J.** Critical evaluation of the usefulness of microscopic leucocyte differential in the follow-up of oncological patients

.http://w1.uzleuven.be/labo/Leermodule/EBLM_CAT/doc/CAT_090630_microscopic_lucocyte_differential.pdf.2009.Consultado em 30 de Janeiro de 2011.

23. **Hsieh MM, Tisdale J F, Rodgers G P.** Neutrophil Count in African American: Lowering the Target Cutoff to initiate or Resume Chemotherapy? *J Clin Oncol*.2010;28:1633-1637.

24. **Drew Provan.** *ABC of Clinical Haematology, Second Edition*.London:Bart's and the London, Queen Mary's;2003.

25. **Butarello M, Plebani M.** Automated Blood Cell Counts - State of the Art. *Am J Clin Pathol*. 2008;130:104-116.

26. **Lantis K L, Harris R J, Davis G.** Elimination of Instrument-Driven Reflex Manual. *Am J Clin Pathol*. 2003;119:656-662.

27. **Lewis, S M.** International Council for Standardization in Haematology – the first 40 years. *Int Jnl Lab Hem*. 2009;31:253-267.

28. **Tsuda I, Hino M, Takubo T, et al.** First basic performance evaluation of the XE-2100 haematology analyser. *JAMMC*. 1999;21:127-133.

29. **Fris-Hansen L, Saelson L, Abildstron S,et al.** An algorithm for applying flagged Sysmex XE-2100 absolute neutrophil counts in clinical practice. *Eur J Hem*. 2008;81:140-153.

30. **Ruzicka K, Veitl M, Thalhammer-scherrer R, et al.** The New Hematology Analyzer Sysmex XE-2100: Performance Evaluation of a Novel White Blood Cell Differential Technology. *Arch Pathol Lab Med*. 2001;125:391-396.

31. **Garvey B, Mahon A, Taggart P, et al.** MHRA Evaluation: *Sysmex XE-2100 haematology analyser*. United Kingdom: Crown; 2003.

32. **Ansari-Lari M A, Kickler T S, Borowitz, M J.** Immature Granulocyte Measurement Using the Sysmex XE-2100- Relationship to Infection and Sepsis. *Am J Clin Pathol*. 2003;120:795-799.

33. **Briggs C, Harrison P, Grant D, et al.** New quantitative parameters on a recently introduced automated blood cell counter - the XE-2100. *Clin Lab Haematol.* 2000;22:345-350.
34. **Ceellie H, Dinkelaar R B, Gelder W.** Examination of peripheral blood films using automated microscopy; evaluation of Diffmaster Octavia and Cellavision DM96. *J Clin Pathol.* 2006; 60:72-79.
35. **Briggs C, Longair I, Slavik M, et al.** Can automated blood film analysis replace the manual differencial? An evaluation of the Cellavision DM96 automated image analysis system. *Int Jnl Lab Hem.* 2009;31:48-60.
36. **Cornet E, Perol J P, Troussard X.** Performance evaluation and relevance of the CellaVision DM96 system in routine analysis and in patients with malignant hematological diseases. *Int Jnl Lab Hem.* 2008;30:56-542.
37. **Kratz A, Bengtsson H I, Casey J E, et al.** Performance Evaluation of the CellaVision DM96 System WBC Differentials by Automated Digital Image Analysis Supported. *Am J Clin Pathol.* 2005;124:770-781.
38. **Pacheco, F C, Cardoso EM.** Imunidade Inata e Adaptativa. In A. F. Arosa, M. E. Cardoso e C. F. Pacheco. *Fundamentos de Imunologia.* Lisboa: Lidel; 2007.
39. **Peters J.** New Hematology Automation Solutions Helps Middlemore Hospital Hematology Laboratory Improve Productivity and accuracy. *Sysmex J Int.* 2010;19:1-3.
40. **Hillman R S, Ault K A.** Quantitative and Qualitative Disorders of Neutrophils. In R. S. Hillman, K. A. Ault e H. M. Rinder. *Hematology in Clinical Practice.* Fourth Edition:McGraw-Hill, 2005.
41. **Kang S H, Kim H K, Ham C K, et al.** Comparison of four hematology analyzers, CELL-DYN Sapphire, ADVIA 120, Coulter LH 750, and Sysmex XE-2100, in terms of clinical usefulness. *Int Jnl Lab Hem.* 2008; 30: 117-123.

42. **Riedl J A, Dinkelaar R B, Gelder W.** Automated morphological analysis of cells in body fluids by the digital microscopy system DM96. *J Clin Pathol.* 2010;63:538-543.

43. **Cameron D.** Management of chemotherapy-associated febrile neutropenia. *B J Cancer.* 2009;101:S18-S22.